Funktionszustände und metabolische Veränderungen von Pyruvat-oxydierenden Mitochondrien des Herzens

PETER BALDE

1960

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545804_0091

Dissertations- und Fotodruck Franz Frank
8 München 13, Zieblandstr. 39, Tel. 597 397

AUS DER EXPERIMENTELLEN ABTEILUNG (PROF.DR. W.BRENDEL) DER CHIRURG.
KLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN (PROF.DR.DR.H.C. R.ZENKER)

FUNKTIONSZUSTÄNDE UND METABOLISCHE VERÄNDERUNGEN VON PYRUVAT-OXYDIERENDEN MITOCHONDRIEN DES HERZENS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Peter Balde
aus München

München 1968

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof.Dr. W.Brendel
Mitberichterstatter:	Prof.Dr.Dr. E.Werle
Dekan:	Prof.Dr. F.Holle

Tag der mündlichen Prüfung: 11.6.68

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Herrn Prof.Dr. W.Brendel bin ich für die Überlassung des Themas und für die großzügige Unterstützung dieser Arbeit zu besonders herzlichem Dank verpflichtet.

Herrn Prof.Dr.Dr. E.Werle möchte ich für die vielseitige Unterstützung und für die Übernahme des Referats herzlich danken.

Herrn Prof.Dr. W.Lamprecht und Herrn Priv.Doz.Dr. G.Schäfer danke ich für die vielseitige Förderung und Unterstützung und für zahlreiche Anregungen bei der Durchführung dieser Arbeit.

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	Theoretischer Teil	7
II.	Aufgabenstellung	21
III.	Experimenteller Teil	22
	A. Methoden	22
	B. Ergebnisse	39
IV.	Diskussion	57
V.	Zusammenfassung	65
VI.	Literaturverzeichnis	67

Verwendete Abkürzungen

AC	Acetat
ACAC	Acetacetat
ACON	Aconitsäure
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AL	Alanin
AMP	Adenosin-5'-phosphat
ASP	Asparaginsäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
CIT	Citrat
DPN	Diphosphopyridinnucleotid
DPNH	Diphosphopyridinnucleotid, reduziert
GTP	Guanosintriphosphat
GDP	Guanosindiphosphat
GLU	Glutaminsäure
HK	Hexokinase
HOB	ß-Hydroxybuttersäure
LDH	Lactat-Dehydrogenase
MAL	Malat
MK	Myokinase
MS	Milchsäure
P_a	anorganisches Phosphat
PEP	Phosphoenolpyruvat
PN	Pyridinnucleotide
PYR	Pyruvat
SUC	Succinat
TPN	Triphosphopyridinnucleotid
TPNH	Triphosphopyridinnucleotid, reduziert
TRA	Triäthanolamin

I THEORETISCHER TEIL

1. Funktion der Herzmitochondrien

Die Mitochondrien sind Hauptenergielieferanten der Muskelzelle. Die von einer Doppelmembran (unit membrane) umhüllten und von doppelwandigen Leisten (cristae mitochondriales) durchzogenen cytoplasmatischen Gebilde enthalten die Enzyme des Zitronensäurezyklus, der Atmungskette, der Atmungskettenphosphorylierung sowie der Fettsäuren-Oxydation. Diese Vielzahl von Enzymen bildet ein räumlich organisiertes, zusammenwirkendes System (1,2,3).
Die Herzmitochondrien liegen nahe den Myofibrillen. Zwischen beiden Strukturen besteht möglicherweise auch ein direkter funktioneller Kontakt. Daher ist die Aufgabe der Mitochondrien die Bereitstellung der für die Muskelkontraktionen erforderlichen Energie in Form von ATP. Diese Energie gewinnt die Herzmuskelzelle durch den Abbau zugeführter Substrate, die sich nach BING (4,5) und nach BERNSMEIER und RUDOLF (6) zu ca. 67% aus nicht veresterten Fettsäuren, 18% Glucose, 16% Milchsäure, 5% Aminosäuren, 4% Ketonkörpern und 0,5% Pyruvat zusammensetzen.
Es ist ein Charakteristikum aller lebenden Zellen, daß die bei der Verbrennung der Substrate freigesetzte Energie nicht als Wärme frei wird; vielmehr werden exergonische Reaktionen häufig mit einer bestimmten endergonischen Reaktion gekoppelt. Diese Reaktion ist die Synthese von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat. ATP gehört zu den sogenannten "energiereichen" Phosphatestern. Bei der Spaltung von ATP kann die in der tertiären Phosphatgruppe enthaltene Hydrolyseenergie wieder freigesetzt werden und zum Antrieb energieverbrauchender Reaktionen herangezogen werden. (Ionentransport, Muskelkontraktion, Syntheseleistungen). Die Zelle verfügt also über einen zentralen Energiespeicher in Form der vorhandenen Menge an ATP (ATP-pool). Der größte Teil dieser Energie wird durch den Mechanismus der Zellatmung, der in den Mitochondrien lokalisiert ist und zu einem kleinen Teil durch den glykolyti-

schen Abbau von Glykogen und Glucose, wie er im Sarkoplasma vor sich geht, gewonnen.
Die völlige Oxydation von Glucose zu Wasser und Kohlendioxyd erfolgt, als Summengleichung zusammengefaßt, in drei Reaktionsfolgen:

(1) $\text{Glucose} + 2\text{DPN}^+ + 2\text{ADP} + 2\text{P}_a \longrightarrow 2\text{BTS} + 2\text{DPNH} + 2\text{H}^+ + 2\text{ATP}$

(2) $2\text{BTS} + 5\text{O}_2 + 30\ \text{ADP} + 30\ \text{P}_a \longrightarrow 6\text{CO}_2 + 4\text{H}_2\text{O} + 30\ \text{ATP}$

(3) $2\text{DPNH} + 2\text{H}^+ + \text{O}_2 + 6\text{ADP} + 6\text{P}_a \longrightarrow 2\text{DPN}^+ + 2\text{H}_2\text{O} + 6\text{ATP}$

---

(4) Summe: $\text{Glucose} + 6\text{O}_2 + 38\text{ADP} + 38\text{P}_a \longrightarrow 6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O} + 38\text{ATP}$

Reaktion 1 symbolisiert den glykolytischen Abbau von Glucose zu Pyruvat nach EMDEN-MEYERHOF und läuft im Sarkoplasma ab, während Reaktion 2 und 3 mitochondrielle Reaktionen sind. Da die Mitochondrienmembran für DPNH nicht permeabel ist (7), kann das extramitochondrial gebildete DPNH (Glykolyse) nur indirekt über den von Bücher (8) beschriebenen enzymatischen Zyklus der Atmungskette zugeführt werden. Dabei wird der Wasserstoff des extramitochondrial gebildeten DPNH durch Glycerin-1Phosphat-Dehydrogenase unter Bildung von Glycerin-1-Phosphat auf Dihydroxyacetonphosphat übertragen. An der Mitochondrienmembran übernimmt die dort lokalisierte Meyerhof-Green'sche Oxydase den Wasserstoff unter Rückbildung von Dihydroxyacetonphosphat. Die Wirksamkeit dieses Zyklus stellt im Flugmuskel der Wanderheuschrecke den Hauptweg für den extra- intra-mitochondrialen Wasserstofftransport dar. Auch in der Leberzelle ist der Anteil des Glycerin-1-Phosphat-Zyklus an der Zellatmung nachgewiesen. Die Rolle dieser Reaktionsfolge für die Herzmuskelzelle ist jedoch noch nicht vollständig geklärt, da die Aktivität der mitochondrialen Glycerin-1-Phosphat-Dehydrogenase hier nur sehr gering ist (9,10). Analog dazu wäre ein von LAMPRECHT und SCHÄFER (11) formulierter Laktat-Zyklus zu diskutieren. Pyruvat soll hierbei durch Laktat-Dehydrogenase zu Laktat reduziert und dann im Mitochondrium durch eine α-Hydroxycarbonsäure-Oxydase (Flavoproteid) wieder zu Pyruvat dehydriert werden.

Reaktion 3 steht summarisch für die Oxydation des DPNH durch die Atmungskette und die damit gekoppelte Atmungskettenphosphorylierung.
Aus obigen Gleichungen ist ersichtlich, daß 95% des ATP bei der vollständigen Oxydation von Glucose in den Mitochondrien synthetisiert werden.
Weiterhin sind die Mitochondrien durch ihr Enzymsystem befähigt, Fettsäuren zu Kohlendioxyd und Wasser zu oxydieren, wobei ebenfalls ein großer Energiebetrag in Form von ATP entsteht. Dies soll am Beispiel der Stearinsäure gezeigt werden. Die Fettsäuren werden, wie die Arbeiten von LYNEN (12) und BLOCH (13) gezeigt haben, zu Acetyl-CoA abgebaut, welches dann via Citrat-Zyklus der Endoxydation unterliegt.

(5) $C_{17}H_{35}COOH + 26O_2 + 147\ ADP + 147\ P_a \longrightarrow 18CO_2 + 9H_2O + 147\ ATP$

Die Reaktionsgleichungen 4 und 5 beschreiben die vollständige Oxydation von Glucose bzw. von Stearinsäure und schließen als Reaktionspartner ADP und anorganisches Phosphat ein. Die Phosphorylierung von ADP zu ATP erfolgt auf zwei Wegen. Neben der Atmungskettenphosphorylierung (s.spätere Beschreibung), die die Hauptquelle für ATP darstellt, kennt man die sogenannte Substratphosphorylierung. Diese stellt den einzigen in der Glykolyse wirksamen Phosphorylierungsmechanismus dar und ist gewissermaßen die Umkehrung von Kinase-Reaktionen, so der Phosphoglycerat-Kinase (1,3,PGS + ADP → 3-PGS + ATP) und der Pyruvatkinase (PBTS + ADP → BTS + ATP). Auch im Zitronensäurezyklus tritt, verbunden mit der oxydativen Decarboxylierung der α-Ketoglutarsäure eine solche Substratphosphorylierung auf, die zur Bildung von GTP führt. GTP kann mit ADP wiederum zu GDP und ATP reagieren.
Nicht das gesamte im Verlauf dieser Reaktionen entstehende ATP steht der Erzeugung mechanischer Energie durch die Myofibrille zur Verfügung. Ein Teil der Energie wird für die Aufrechterhaltung von Ionengradienten an Zell-

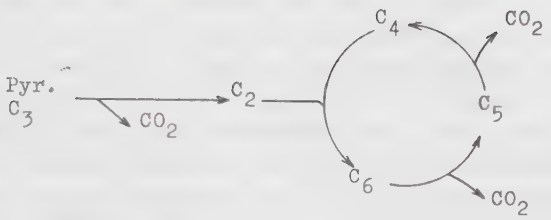
und Mitochondrienmembran und für Syntheseleistungen benötigt. Außerdem ist die Strukturerhaltung der Mitochondrien an die Anwesenheit von ATP gebunden. (14)

2. Oxydation von Brenztraubensäure durch Herzmitochondrien

Die Brenztraubensäureoxydation kann schematisch in drei Reaktionsschritte aufgeteilt werden: a) Oxydation der C-Atome zu Kohlendioxyd (Citronensäurezyklus). b) Die Oxydation des Wasserstoffs zu Wasser (Atmungskette). c) Die Phosphorylierung von ADP zu ATP (Atmungskettenphosphorylierung).

a) Citronensäurezyklus (Krebszyklus) und seine Nebenwege

Die Brenztraubensäure wird zuerst oxydativ zu Essigsäure decarboxyliert. Die Essigsäure tritt an Coenzym A gebunden als "aktivierte Essigsäure" in den Citratzyklus ein (15,16). Diese C_2-Verbindung wird im Zyklus zu $2CO_2$ oxydiert. Hier aber kondensiert zunächst die C_2-Verbindung mit einer C_4-Verbindung (Oxalessigsäure) zu einer C_6-Verbindung (Citronensäure). Im weiteren Verlauf der nachfolgenden Reaktionen wird zweimal CO_2 durch Decarboxylierung abgespalten, und die C_4-Verbindung (Oxalacetat) wieder regeneriert. Hiermit ist die vollständige Oxydation der Kohlenwasserstoffkette des Pyruvats abgeschlossen. Der im Laufe der Dehydrierungsreaktionen freiwerdende Wasserstoff wird, wie aus den Gleichungen 1 bis 12 ersichtlich ist, jeweils auf ein wasserstoffübertragendes Coferment übertragen. Im wesentlichen sind dies die Pyridinnucleotide und für den Schritt der Succinatoxydation das FAD.



Schema des Citratzyklus (17)

Im einzelnen umfaßt der Citratzyklus bei der Pyruvatoxydation folgende Reaktionen:

1.) $CH_3COCOOH+HSCoA+DPN^+ \longrightarrow CH_3COSCoA+DPNH+H^++CO_2$

2.) $CH_3COSCoA+HOOCOCH_2COOH \longrightarrow HOOCCH_2COH(COOH)CH_2COOH+HSCoA$

3.) $HOOCCH_2COH(COOH)CH_2COOH \longrightarrow HOOCCH=C(COOH)CH_2COOH+ H_2O$

4.) $HOOCCH=C(COOH)CH_2COOH+H_2O \rightarrow HOOCCHOHCH(COOH)CH_2COOH$

5.) $HOOCCHOH(COOH)CH_2COOH+TPN^+ \rightarrow HOOCCOCH(COOH)CH_2COOH+TPNH+H^+$

6.) $HOOCCOCH(COOH)CH_2COOH \longrightarrow HOOCCOCH_2CH_2COOH + CO_2$

7.) $HOOCCOCH_2CH_2COOH + DPN^+ + HSCoA \longrightarrow HOOCCH_2CH_2COSCoA+DPNH+H^++CO_2$

8.) $HOOCCH_2CH_2COSCoA+GDP+ \longrightarrow HOOCCH_2CH_2COOH+GTP+HSCoA$

9.) $GTP + ADP \longrightarrow ATP + GDP$

10.) $HOOCCH_2CH_2COOH + FAD \longrightarrow HOOCCH=CHCOOH + FADH_2$

11.) $HOOCCH=CHCOOH + H_2O \longrightarrow HOOCCHOHCH_2COOH$

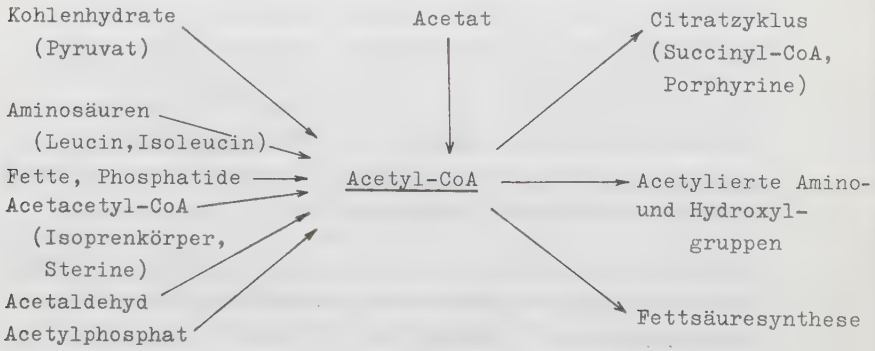
12.) $HOOCCHOHCH_2COOH + DPN^+ \longrightarrow HOOCCH_2COCOOH + DPNH+ H^+$

Summe: $CH_3COCOOH+3DPN^++TPN^++FAD+ADP+H_2O \rightarrow 3CO_2+3DPNH+3H^+ +TPNH+H^++FADH_2+ATP$

Jede dieser zwölf Reaktionen wird durch spezifische Enzyme, die in den Mitochondrien lokalisiert sind, katalysiert. Bei der Oxydation der Brenztraubensäure werden somit drei DPN, ein TPN und die prosthetische Gruppe der

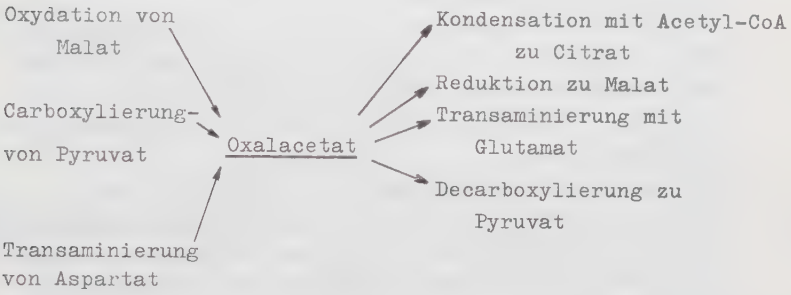
Succinatdehydrogenase (FAD) reduziert. Außerdem wird im Zuge der erwähnten Substratphosphorylierung eine energiereiche Phosphatbindung synthetisiert, die jedoch ihre energiereiche Bindung auf ADP unter Bildung von ATP übertragen kann. Infolge der Reoxydation der reduzierten Coenzyme durch molekularen Sauerstoff entsteht Wasser und, wie später gezeigt wird, durch Phosphorylierung von ADP, eine beträchtliche Anzahl von energiereichen Phosphatbindungen. Die Oxydation von einem Mol Pyruvat liefert insgesamt drei Mole DPNH, ein Mol TPNH und ein Mol $FADH_2$, deren Reoxydation die Energie zur Synthese von 14 Molen ATP liefert. Bei Berücksichtigung der Bildung von GTP entstehen also aus einem Mol Pyruvat insgesamt 15 Mol ATP.

Die einzelnen intermediären Produkte des Citratzyklus können zum Teil auch bei anderen Vorgängen entstehen oder weiter reagieren. Dies betrifft vor allem Acetyl-Coenzym- A und Oxalacetat. Die Vielzahl der Umsatzmöglichkeiten macht sie zu sogenannten "Schlüsselsubstraten" des intermediären Stoffwechsels. Das unten dargestellte Schema zeigt die zentrale Stellung von Acetyl-Coenzym A zwischen Kohlenhydratoxydation, Zitratzyklus, Fettsäureabbau und Fettsäure- sowie Ketonkörpersynthese.



Schema: Acetyl-CoA im Intermediärstoffwechsel

Desgleichen ist in einem weiteren Schema eine Reihe von Oxalacetat liefernden oder verbrauchenden Reaktionen dargestellt. Es ist naheliegend, daß sich wesentliche regulatorische Funktionen im intermediären Stoffwechsel durch die Selektion des unter einer bestimmten Stoffwechselsituation bevorzugten Reaktionsweges dieser Substrate ausdrücken.



Schema: Oxalacetat im Intermediärstoffwechsel (18)

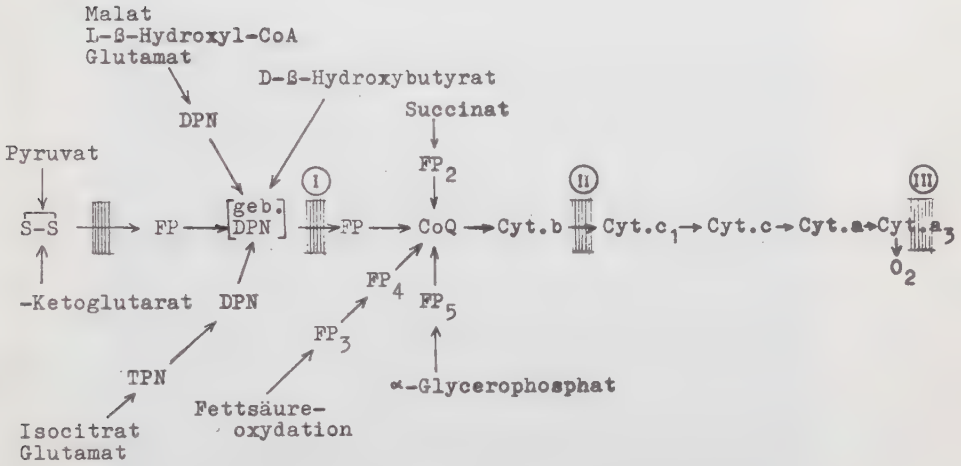
Besonders eng ist auch der Stoffwechsel der Aminosäuren und der Ketosäuren des Citratzyklus verbunden. Durch Transaminierung können Brenztraubensäure, Oxalessigsäure, α-Ketoglutarsäure in die Aminosäuren Alanin, Asparaginsäure, Glutaminsäure umgewandelt werden. Umgekehrt können diese Aminosäuren durch Transaminierung der Oxydation via Citratzyklus zugänglich gemacht werden. Diese Reaktionen spielen unter anderem bei der Einschmelzung von Protein im Diabetes mellitus eine wichtige Rolle. Daneben sind sie für die Glykoneogenese aus Aminosäuren von Bedeutung.
Wegen der Bedeutung der "Ketonkörper" im normalen und besonders im diabetischen Stoffwechsel soll im folgenden auf deren Entstehung eingegangen werden.
Bei einem Überschuß von Acetyl-CoA entstehen auch im normalen Stoffwechselablauf Acetessigsäure und ß-Hydroxy-Buttersäure. Aus zwei Acetyl-CoA entsteht ein Acetoacetyl-CoA, aus dem durch weitere Reaktion mit einem

Acetyl-CoA unter Abspaltung von einem Mol CoA ß-Hydroxy-ß-methyl-glutaryl-CoA entsteht (19). Dieses wird wieder gespalten in je ein Mol Acetyl-CoA und Acetessigsäure. Durch die ß-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase kann nun die Acetessigsäure zu ß-Hydroxybuttersäure reduziert werden (20). Diese letzte Reaktion ist DPNH-abhängig. Bei dieser Reaktionsfolge werden bilanzmäßig zwei Moleküle Acetyl-CoA in Acetessigsäure bzw. ß-Hydroxybuttersäure und zwei Moleküle CoA-SH verwandelt.
Die Bildung von ß-Hydroxybuttersäure in den Mitochondrien stellt ähnlich wie die von Laktat eine "Sackgasse" im Stoffwechsel dar, da diese Substanzen nur wieder in der Umkehrung des Bildungsweges mit dem gleichen Enzym weiterreagieren können.
Die physiologische Bedeutung der Ketonkörper wird in letzter Zeit durch Arbeiten von KREBS (21,22), DEVLIN (23) und KLINGENBERG (24) neu diskutiert. Im Gegensatz zu anderen Autoren kommt nach DEVLIN dem Substratpaar Acetessigsäure / ß-Hydroxybuttersäure eine Rolle bei der Überführung des glykolytischen Wasserstoffs vom extra- in den intramitochondrialen Raum zu. Krebs und Mitarbeiter bewiesen eine atmungsfördernde Wirkung von Acetacetat bei der Oxydation von Glucose. Nach Klingenberg bewirkt das Substratpaar AcAc/HOB, welches auch durch die Mitochondrien in die Blutbahn gelangt, durch das hohe negative Redoxpotential eine Koordination der Redoxpotentiale des mitochondrialen DPN-Systems zwischen verschiedenen Organen über den Blutkreislauf.

b) Atmungskette

Die Fähigkeit der Zelle, die verschiedenartigen Substrate, die beim Abbau der Nahrungsstoffe entstehen, zum Zwecke der Energiegewinnung auszunützen, beruht darauf, daß sie durch eine Vielzahl verschiedener Dehydrogenasen den Wasserstoff der Substrate auf die gleichen Pyridinnucleotide (DPN, TPN) überträgt. Diese werden durch die Atmungs-

kette unter Sauerstoffaufnahme reoxydiert. Die Wasserstoffübertragung und der Elektronentransport in der Atmungskette soll durch folgendes Schema veranschaulicht werden :



Schema: Darstellung der Atmungskette (25)

Im obigen Schema geben die Pfeile die Richtung des Wasserstoff- bzw. des Elektronentransportes an. Die Reihenfolge der Enzyme in der Atmungskette läßt sich auf Grund der Redoxpotentiale der prosthetischen Gruppen leicht verstehen. Das negativste Potential hat das Diphosphorpyridinnucleotidsystem DPNH + H^+/DPN mit -280 mV, während das Redoxpotential der Cytochrome zwischen -40 und +290 mV liegt. Der Wasserstoff der Substrate, der auf DPNH bzw. TPNH übertragen wurde, wird auf die prosthetische Gruppe der Flavoproteide übertragen. Von der Stufe der Flavine wird der Wasserstoff auf Coenzym Q

(Ubichinon) übertragen, an welches sich die Kette der Cytochrome (Cytochrom b, Cyt.c_1, Cyt.c, Cyt.a, Cyt.a_3) anschließt. Bei der Oxydation des reduzierten Flavoproteids der Atmungskette werden zwei Wasserstoffionen gebildet und die Elektronen vom Hämin der Cytochromkette übernommen. Durch die katalytische Wirkung von Cyt.a-a_3 werden die Elektronen auf molekularen Sauerstoff übertragen, wobei ein Sauerstoffion entsteht, das sich mit dem vorher gebildeten Wasserstoffproton sofort zu Wasser vereinigt. Neben dem Flavoproteid der Atmungskette existiert in den Mitochondrien eine Anzahl von Enzymen, welche ebenfalls Flavin (FMN,FAD) als prosthetische Gruppe aufweisen. Von diesen sind besonders die Succinatdehydrogenase (FP_2), die α-Glycerophosphatdehydrogenase (FP_5) und die Flavoproteide der Fettsäureoxydation (FP_3,FP_4) zu nennen. Diese Flavoproteide sind in obigem Schema als $FP_{2,3,4,5}$ bezeichnet und übertragen den Wasserstoff bzw. die Elektronen auf das Coenzym Q der Atmungskette. Der Gesamtvorgang entspricht dem der Knallgasreaktion $2H_2+O_2 \rightarrow 2H_2O$, bei der eine Energie von 52 Kal/Mol frei wird. In der Atmungskette ist dieser Vorgang jedoch in einer Elektronenleitung über die Cytochrome in einen stufenweisen Elektronentransport unterteilt. Hierbei wird auch die Reaktionsenergie in Stufen freigesetzt. An drei Stellen dieses Systems sind mit dem Elektronentransport Reaktionen gekoppelt, welche die frei werdende Reaktionsenergie zur Synthese von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat verwenden können. Man bezeichnet dieses System als Atmungskettenphosphorylierung.

c) Atmungskettenphosphorylierung

Die Bedeutung der Atmungskettenphosphorylierung liegt darin, daß bei der stufenweisen Oxydation des Wasserstoffs die freie Energie der Oxydation als chemische Energie in Form von ATP gespeichert wird. Zwischen dem Wasserstoff, der an DPNH gebunden ist, und dem Sauerstoff besteht eine Potentialdifferenz von 1,13 V, die einer

freien Energie von 52 Kcal entspricht. Ein Teil dieser Energie wird bei der oxydativen Phosphorylierung chemisch gebunden. Es konnte nachgewiesen werden, daß bei der Veratmung von 1/2 O_2 bzw. bei der Oxydation von einem DPNH drei ATP aus ADP und anorganischem Phosphat entstehen. Zur Bildung von drei ATP sind 27 Kcal erforderlich. Da bei der Oxydation des Wasserstoffs 52 Kcal freie Energie entsteht, würde das einem Wirkungsgrad von 52 % entsprechen.

In verschiedenen Arbeiten (26,27) wurden unter geeigneten Versuchsbedingungen einzelne Teilreaktionen der Wasserstoffoxydation in der Atmungskette mit Hilfe spezifischer Inhibitoren untersucht. Es zeigte sich dabei, daß beim Wasserstoff- bzw. Elektronenübergang vom DPNH auf Flavoproteid, vom Flavoproteid auf Cyt. c und vom Cyt. a auf Sauerstoff je ein Molekül ATP durch Phosphorylierung von ADP gebildet wird. Für Substrate, die ihren Wasserstoff über DPNH der Atmungskette zuführen, ergibt sich somit ein P/O-Quotient von drei. Als P/O-Quotient definiert man die pro Mol oxydierten DPNH + H^+ bzw. pro Atom aufgenommenem Sauerstoff, zur ATP-Synthese aufgenommenen Mole Phosphat. Die Bestimmung des P/O-Quotienten liefert also ein Maß für die Wirksamkeit der oxydativen Phosphorylierung, d.h. für die Energieausbeute bei der mitochondrialen Oxydation von Substraten. Substrate, wie Glycerin-1-Phosphat oder Succinat, die direkt von einem Flavoproteid oxydiert werden (s. Schema der Atmungskette), ergeben dagegen einen P/O-Quotienten von zwei, da zwischen FP und O_2 nur zwei phosphorylierende Schritte liegen.

Über den Mechanismus der oxydativen Phosphorylierung sind von verschiedenen Autoren (28,29) hypothetische Reaktionsfolgen aufgestellt worden. Nach LEHNINGER (26) MYERS und SLATER (30,31) läßt sich folgende Reaktionsfolge formulieren :

(1) $AH_2 + B + I \longrightarrow A\sim I + BH_2$

(2) $A\sim I + X \longrightarrow X\sim I + A$

(3) $X\sim I + P_a \longrightarrow X\sim P + I$

(4) $X\sim P + ADP \longrightarrow X + ATP$

Demzufolge würde die Oxydoreduktion zwischen zwei aufeinanderfolgenden Gliedern der Atmungskette (AH_2 ist Wasserstoff-Donator, B ist Wasserstoff-Akzeptor) zuerst zu einer energiereichen Bindung zwischen der oxydierten Form A und einer Komponente I führen. Die Spaltung dieser Bindung A~I wird nun nicht direkt mit einer Phosphorylierung gekoppelt, sondern auf einen zweiten Faktor X übertragen, wobei die Komponente A der Atmungskette wieder frei wird. Die Verbindung X~I reagiert nun mit anorganischem Phosphat zu einer reaktionsfähigen Phosphatverbindung X~P. Die wichtigste Reaktion ist dann die phosphorylierende Spaltung der energiereichen Bindung X~P, wobei ADP terminaler Phosphatakzeptor ist.

3. Atmungskontrolle und funktionelle Zustände von Mitochondrien

Ein Charakteristikum für die Intaktheit isolierter Mitochondrien ist die Kontrolle der Atmung durch oxydative Phosphorylierung (32). Sie beruht auf der Reversibilität der phosphorylierenden und Elektronen-transportierenden Reaktionen, welche den Gesetzen für thermodynamische Gleichgewichte gehorchen. So können unter geeigneten Bedingungen unter Spaltung von ATP zu ADP und anorganischem Phosphat Elektronen auch vom Bereich der Cytochrome zum DPNH zurücktransportiert werden (33,34).
Diese enge Kopplung zwischen Elektronentransport bzw. Atmung und Phosphorylierung drückt sich in der Kinetik der mitochondrialen Atmung aus. Maximale Atmung wird nur dann erreicht, wenn zusätzlich zu oxydierbarem Substrat auch

die Reaktionspartner der phosphorylierenden Reaktion, also ADP und anorganisches Phosphat, vorhanden sind. Fehlt ADP, so bewirkt die dadurch verlangsamte Phosphorylierung einen verlangsamten Elektronentransport und damit geringe mitochondriale Atmung. Das gleiche kann beobachtet werden, wenn bei genügendem ADP-Angebot - maximale Atmung - ein Überschuß von ATP den Mitochondrien zugesetzt wird. Die Atmungsgeschwindigkeit wird vermindert. Man bezeichnet den Zustand mit maximaler Atmung als "aktiven Zustand", den Zustand unter ADP-Mangel "kontrollierten Zustand" substratgesättigter Mitochondrien.

Fehlerhaft präparierte Mitochondrien zeigen keine Atmungskontrolle, intakte Mitochondrien verlieren nach längerem Stehen die Eigenschaft der Atmungskontrolle. Der Grund dafür dürfte in einem Anstieg der ATPase-Aktivität und Strukturschädigungen liegen. Bei allen dynamischen Stoffwechseluntersuchungen an Mitochondrien müssen diese Atmungskontrolle aufweisen, da nur solche Mitochondrien als funktionell intakt gelten können.

Infolge der Reaktionsabläufe und den eben beschriebenen Mechanismen der Atmungskontrolle stellt sich bei der Oxydation des Wasserstoffs in der Atmungskette ein stationärer Atmungszustand ein, ein sogenanntes Fließgleichgewicht, das vom O_2-Angebot, von der Substratkonzentration und vor allem von der Kopplung mit der oxydativen Phosphorylierung beeinflußt wird. Macht man die Atmungsaktivität jeweils von nur einem Parameter abhängig, so lassen sich nach CHANCE (35) fünf verschiedene Funktionszustände der Atmungskette definieren. Diese Zustände können experimentell an isolierten Mitochondrien leicht durch polarographische Messung der Atmungsgeschwindigkeit demonstriert werden.
Ein Atmungsvorgang ist vom Angebot an ADP und anorganischem Phosphat, Substrat und Sauerstoff abhängig. Fehlt eine dieser Verbindungen oder wird deren Konzentration sehr gering, so wird diese, wie Zustand 1,2 und 5 zeigen,

limitierend für die respiratorische Aktivität. Im Zustand 3 liegt ein Überschuß aller notwendigen Reaktionpartner vor, woraus maximale Geschwindigkeit des Elektronenflusses in der Atmungskette und damit maximale Atmung resultieren. Im Zustand 4 wird ebenfalls in gekoppelter Reaktion aus ADP und anorganischem Phosphat ATP gebildet, jedoch begrenzt hier die geringe im Fließgleichgewicht vorhandene ADP-Konzentration die Gesamtreaktion und damit die Atmung. Die folgende Tabelle soll diese Funktionszustände veranschaulichen :

Limitierender Faktor	Zustand	O_2	Substrat	ADP u. P_a	Atmung
ADP/Subst.	1	Übersch.	Endogen	Endogen	langsam
Subst.	2	Übersch.	geg. Null	Übersch.	sehr langs.
Atmungskette	3	Übersch.	Übersch.	Übersch.	schnell
ADP	4	Übersch.	Übersch.	geg. Null	langsam
O_2	5	geg. Null	Übersch.	Übersch.	keine

Tabelle 1 : Darstellung der Funktionszustände der Mitochondrienatmung.

II AUFGABENSTELLUNG

In der vorliegenden Arbeit war zur Aufgabe gestellt, ein möglichst breites Spektrum von mitochondrialen Substraten während der Oxydation von Pyruvat in Abhängigkeit von definierten Funktionszuständen der Atmungskette zu untersuchen. Im einzelnen bedeutet dies:

1. Isolierung von Herzmitochondrien des Kaninchens, die Atmungskontrolle aufweisen. Die Bestimmung der Atmungsgröße ist dabei durch polarographische Messung des Sauerstoffverbrauchs zu ermitteln. Synchron mit dieser Messung soll die Reproduzierbarkeit der Funktionszustände durch Registrierung des Reduktionsgrades der mitochondrialen Pyridinnucleotide beobachtet werden.
2. Ausarbeitung einer chromatographischen Methode zur Trennung von Intermediaten des Citratzyklus und der aus diesen im Stoffwechsel entstehenden Aminosäuren.
3. Bestimmung der Radioaktivität von organischen Säuren in aeroben und anaeroben Funktionszuständen während der Oxydation von 3-^{14}C-Pyruvat durch Mitochondrien des Kaninchenherzens.
4. Bestimmung von stationären Konzentrationen der Adeninnucleotide ATP, ADP, AMP unter den Versuchsbedingungen von 3.

III EXPERIMENTELLER TEIL

A. Beschreibung der Methoden

1. Isolierung der Herzmitochondrien

Bei der Isolierung der Mitochondrien werden alle Arbeitsgänge zwischen 0 und +2 C^{o} durchgeführt.
Frisch entnommene Kaninchenherzen werden in KCL-Lösung (0,18M) gebracht, von Blut befreit und das reine Muskelgewebe präpariert. Dieses wird mit der Schere zerkleinert und mit ca. 10 ml Isolationsmedium (180 mM KCL, 2mM Äthylendiamin-tetra-essigsäure, 1% Rinderalbumin) im Kugelhomogenisator vorhomogenisiert. Der so erhaltene Gewebebrei wird kurze Zeit mit einem Potter-Homogenisator aufgeschlossen. Das Homogenat wird zehn Minuten bei 800 x g in der Kälte zentrifugiert. Das Sediment, das aus unbeschädigten Zellen, Zellkernen und Zellmembranen besteht, wird verworfen, während der Überstand nochmals zehn Minuten bei 7500 x g zentrifugiert wird. Bei dieser zweiten Zentrifugation werden die Mitochondrien sedimentiert. Der Überstand wird verworfen, das Sediment mit 10 ml Isolationsmedium rehomogenisiert. Die Mitochondriensuspension wird noch einmal bei 7500 x g zentrifugiert. Die so gewaschenen Mitochondrien werden mit 2ml KCL-Lösung (0,18M) in einem Potter-Homogenisator vorsichtig homogenisiert und im Eisbad aufbewahrt.
Bei Mitochondrien, die nach dieser Methode isoliert werden, läßt sich noch nach 5 Stunden eine fast unverminderte "Atmungskontrolle" nachweisen.

2. Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der Mitochondrienstammsuspension wird nach der modifizierten Biuretmethode von WEICHSELBAUM bestimmt (36).

0,05 ml Mitochondrienstammsuspension werden in einem Zentrifugenglas mit 0,8 ml dest. Wasser verdünnt. Mit 0,15 ml 3M-Trichloressigsäure wird das Protein ausgefällt. Der Niederschlag wird abzentrifugiert, der Überstand verworfen. Der Niederschlag wird mit 5ml Biuretreagenz versetzt und gut gemischt. Nach 30 Minuten wird mit 5 ml dest. Wasser auf 10 ml aufgefüllt und bei 546mμ und der Schichtdicke 10 mm die Extinktion gegen den Blindwert gemessen.
Die Extinktion mit dem Faktor 33 multipliziert ergibt die Menge Protein in mg pro Bestimmungsansatz. Der Faktor ergibt sich aus der Eichung des Verfahrens mit einer Standardlösung von Serumalbumin.

3. Polarographische Methode der Sauerstoffverbrauch-Messung

Der Sauerstoffverbrauch wird mit einer vibrierenden Platinelektrode (Bezugselektrode: Kalomel) nach einer von B.CHANCE und G.R. WILLIAMS (37) beschriebenen Methode in einer offenen Küvette bestimmt. Diese Messung erfolgt synchron mit der Fluoreszenzmessung in derselben Küvette. Die Platinelektrode wird nach den Angaben von HAGIHARA (38) mit Kollodium überzogen. Die Frequenz der Schwingung beträgt 50 Hz in vertikaler Richtung. Die Polarisationsspannung wird auf 0,6 V eingestellt, der Strom, der der Sauerstoffkonzentration in der Küvette proportional ist, mit einem Polarographen (Radiometer PO4) amperometrisch registriert.
Zur Messung der Kinetik des Sauerstoffverbrauchs werden 0,05 ml der Mito-Präparation in 2,9 ml Inkubationsmedium suspendiert. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe der 3-^{14}C-Pyruvatlösung. Der Zustand der "aktiven Atmung" wird durch Zugabe von 8-10 μl einer ADP-Lösung geeigneter Konzentration induziert. Da die Mitochondrienatmung in dieser Versuchsanordnung verhältnismäßig hohe Werte annimmt, kann die nur bei geringen Atmungsgrößen ins Gewicht fallende Rückdiffusion von Sauerstoff in die offene Meßzelle unberücksichtigt bleiben. Eine Korrektur der Atmungskurve nach KUNZ und MÜLLER (39) erübrigt sich daher.

4. Messung des Reduktionsgrades der Pyridinnucleotide in intakten Mitochondrien

Da sich der Reduktionsgrad von mitochondrialen Pyridinnucleotiden bei Stoffwechselübergängen ändert, kann diese Messung als empfindlicher Indikator der Intaktheit und des Stoffwechselzustandes herangezogen werden. Mit Hilfe empfindlicher Verfahren kann die Summe der im jeweiligen Funktionszustand vorhandenen reduzierten Pyridinnucleotide in Suspension intakter Mitochondrien fortlaufend registriert werden. Hierzu dient u.a. die hier angewandte Messung der Fluoreszenz der mitochondrialen Pyridinnucleotide. Diese wird in Anlehnung an eine von R.W.ESTABROOK(40,41) beschriebene Methode, die mit Hilfe eines speziell modifizierten Fluorimeters -Eppendorf-, der mit einer automatischen Registriereinrichtung versehen ist, gemessen. Als Anregungswellenlängen werden die Wellenlängen 366 und 313nm einer Hg-Hochdrucklampe durch Filter selektiert. Das Fluoreszenzlicht, dessen Maximum bei 450nm liegt, wird unter einem Winkel von 30° gemessen. Hierbei dient ein Interferenzfilter von 440-460nm als Filter für die sekundäre Strahlung.
Eine Zunahme der Fluoreszenzemission entspricht einer Zunahme von reduzierten Pyridinnucleotiden (hierbei kann nicht unterschieden werden zwischen DPNH und TPNH), also einer Reduktion. Eine Abnahme entspricht somit einer Oxydation der Gesamt-Pyridinnucleotide.
Die Messung erfolgt in einer 10 mm Quarz-Küvette synchron mit der Sauerstoffmessung.

5. Inkubationsansätze

Die Inkubation wird bei 28°C durchgeführt. Als Inkubationsmedium dient eine 0,15 M KCl-Lösung, die 3,9 mM Magnesiumchlorid und 2,9 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4) enthält.
Das Reaktionsvolumen des Vorversuchs setzt sich aus 2,9ml

Inkubationsmedium, 0,05 ml Mitochondrienstammsuspension und 0,05 ml 3-^{14}C-Pyruvat-und ADP-Lösung zusammen. Die geeignete Pyruvatkonzentration muß jeweils durch Vorversuche ermittelt werden. Die Pyruvatkonzentration wird in den Versuchen so gering gehalten, daß der im Inkubationsansatz gelöste Sauerstoff ausreicht, um das gesamte zugesetzte Pyruvat zu oxydieren. Hiermit soll der Tatsache Rechnung getragen werden, daß auch unter physiologischen Bedingungen das Pyruvatangebot sehr gering ist (42), im Gegensatz zu den um mehrere Zehnerpotenzen höheren Konzentrationen, wie sie in der Mehrzahl von veröffentlichten in vitro Experimenten angewandt wurden (43,44).
Im allgemeinen erfolgte eine Minute nach Pyruvatzugabe ein einmaliger ADP-Zusatz, um einen Phosphorylierungszyklus auszulösen. Die Atmung und die reduzierten Pyridinnucleotide wurden während des ganzen Versuchs registriert. Die Mitochondrien wurden nach Verbrauch des gelösten Sauerstoffs unter Stickstoff anaerob gehalten.
Die im Vorversuch erhaltenen Registrierungen der Atmungsgeschwindigkeit und des Reduktionsgrades dienen als Grundlage für die Festlegung der Entnahmezeiten für die Metabolitbestimmungen.
Bei der Durchführung des Hauptversuches wird dann unter Einhaltung des genau gleichen Zeitplanes ein Vielfaches der einzelnen Lösungen des Vorversuches eingesetzt. Den Versuchsbedingungen entsprechend werden dann in bestimmten Zeitabständen aliquote Teile des Hauptansatzes zur Bestimmung der Metaboliten entnommen und enteiweißt.

6. Enteiweißung der Proben

Es wird jeweils ein aliquoter Teil von 2 ml in ein vorgekühltes mit 0,15 ml 60%iger Perchlorsäure beschicktes und mit Stickstoff gefülltes Zentrifugenglas einpipettiert. Nach kurzem Stehen im Eisbad wird bei 3000 U/Min. das ausgefallene Eiweiß abzentrifugiert. Der Überstand wird mit 3molarer Kaliumcarbonat-Lösung neutralisiert und auf pH 7 eingestellt. Das bei der Neutralisation ausgefallene Kalium-

perchlorat wird abzentrifugiert, der Überstand abdekantiert und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -16°C eingefroren.

7. Bestimmung der ^{14}C-Aktivität im Kohlendioxyd

Es wird ein von SCHÄFER und EMMERICH (45) entwickeltes Warburg-Inkubationsgefäß verwendet.
Es besteht aus einem Schlifftrog, in den ein weitlumiger Kamin eingesetzt wird. Der Durchmesser des Trogs beträgt 2,2 cm und hat ein Volumen von 9 ml. Der Kamin, 13 cm lang, ist oben mit einem Gummistopfen dicht verschlossen; an der Seite trägt er einen gebogenen Seitenarm, an dessen Ende eine Schliffbirne angebracht wird, die 2,5 ml faßt. Der gebogene Seitenarm trägt am höchsten Punkt der Krümmung einen offenen Zapfen, den eine Gummikappe dicht verschließt.
Zur $^{14}CO_2$-Bestimmung füllt man den Schlifftrog mit 0,5 ml Äthanolamin, die Schliffbirne mit 0,2 ml 70%iger Perchlorsäure. Der Kamin mit der Schliffbirne wird nun auf den Trog aufgesetzt, und die vorher gefetteten Schliffverbindungen mit Federn gesichert.
Aliquote Teile von 0,5 ml werden aus dem Inkubationsgefäß mit einer Insulinspritze entnommen und mit Hilfe einer vorher durch die Gummikappe gestoßenen Kanüle direkt in die Perchlorsäure eingespritzt. Die Kanüle wird zusammen mit der aufgesetzten Spritze entfernt. Nach 24stündigem Stehen bei Zimmertemperatur und kurzem Erwärmen der Schliffbirne auf 35°C ist das gesamte durch die Perchlorsäure ausgetriebene CO_2 vom Äthanolamin absorbiert. Die ^{14}C-Aktivität im Äthanolamin wird mit einer Flüssigkeits-Scintillationsmethode, die unten beschrieben wird, bestimmt.

8. Chromatographie der organischen Säuren

Zur Trennung der organischen Säuren müssen mehrere chromatographische Methoden kombiniert werden. Eine Trennung der Säuren wird mit Hilfe der Ionenaustauscherchromatographie nur teilweise erreicht. Die hierbei in Gruppen aufgetrennten Säuren trennt man unter Anwendung der

Chromatographie an Kieselgelsäulen und der Dünnschichtchromatographie in Einzelsubstanzen auf.

a) Ionenaustauscherchromatographie

Die Gruppenauftrennung der organischen Säuren mit Dowex-Ionenaustauscher erfolgt nach einer von R.W.VON KORFF (46) beschriebenen Methode. Dieses Verfahren ist eine Gradientenelution und liefert gut reproduzierbare Gipfel, die durch ^{14}C-markierte Vergleichssubstanzen in zahlreichen Voruntersuchungen identifiziert werden.
Die Ionenaustauscherchromatographie wird an Dowex1-X8 (CL^-) 200-400 mesh (AG-grade, Bio-Rad Laboratories) durchgeführt. Da das Harz öfters noch Spuren HCL enthält, wäscht man es mit dest. Wasser und versetzt das Waschwasser mit verdünnter NaOH, bis die Harzsuspension einen pH von 6 zeigt. Eine 1 x 14 cm hohe Säulenfüllung wird erreicht durch Einschütten der wässrigen Harzsuspension in eine Glasröhre von 1 cm Querschnitt und 30 cm Länge, die unten mit Glaswolle abgedichtet und mit einem Schliffhahn versehen ist. Um eine dichte und homogene Packung der Säule zu erreichen, läßt man 50 ml dest. Wasser durch das Harz laufen. Vor dem Auftragen der Analysenlösung soll der Wasserspiegel über dem oberen Harzrand nicht mehr als zwei mm betragen. Ein aliquoter Teil (1 ml) des neutralisierten Perchlorsäureextraktes (Anaysenlösung) wird nun auf die Säule aufgetragen. Nach Einsickern der Analysenlösung spült man mit 1,5 ml dest. Wasser nach und füllt die Säule bis oben mit Wasser. Ein Silikonschlauch verbindet die Säule mit dem rechtwinkligen Seitenarm des Gradientengefäßes. Dieses besteht aus einem Erlenmeyerkolben mit seitlichem Abflußrohr in der Bodenebene. Dem Erlenmeyerkolben ist ein angeschliffener Scheidetrichter, dessen Ausflußrohr bis 1 cm über den Boden des Kolbens reicht, aufgesetzt. Der Erlenmeyerkolben, der als Mischgefäß dient, wird mit 250ml dest. Wasser, der Scheidetrichter mit 90 ml 0,075 n HCL gefüllt. Unter das Mischgefäß ist eine Magnetrührer montiert. Nach Beginn der Elution werden mit Hilfe eines

Fraktionsschneiders 2 ml-Fraktionen aufgefangen. Die Durchflußgeschwindigkeit beträgt drei Tropfen pro 10 Sek., das entspricht 50 ml Eluat pro Stunde. Es werden insgesamt 75 Fraktionen zu je 2 ml aufgefangen. Nach 45 Fraktionen wird die CL^--Ionen-Konzentration im Scheidetrichter von 0,075 n auf 0, 1 n erhöht, um den Arbeitsgang abzukürzen. Um eine optimale Trennung zu erhalten, soll der Gradient nach 30 Fraktionen (60 ml) nicht über 0,01 n HCL liegen.

Die Entwicklung des Chromatogramms erfolgt durch Messung der Radioaktivität mit Hilfe einer Flüssigkeits-Scintillationsmethode. Es werden aliquote Teile von 0,5 ml jeder Fraktion zur 14C-Aktivitätsmessung eingesetzt. Die restlichen 1,5 ml pro Fraktion werden zur weiteren Analyse benötigt. Nach der Entwicklung des Chromatogramms werden diejenigen Fraktionen vereinigt, welche jeweils eine Gruppe von Säuren enthalten, die durch weitere Verfahren vollständig aufgetrennt werden kann. Die vereinigten Eluate werden neutralisiert und im Rotationsverdampfer bei 14mm Hg und 25°C zur Trockene eingedampft. Die so erhaltenen Proben werden in 1 ml dest. Wasser aufgenommen und bis zur weiteren Analyse eingefroren.

Abb. 1 gibt ein Beispiel für ein Ionenaustauscherchromatogramm. Der Gipfel A enthält Alanin, Gipfel B eine unbekannte Aminosäure. Die Fraktionen des Gipfels C enthalten Asparaginsäure, Glutaminsäure, Essigsäure und ß-Hydroxybuttersäure. Die Fraktionen der Gipfel D und E enthalten Bernsteinsäure, Acetessigsäure, Äpfelsäure und cis-Aconitsäure. In den Fraktionen der Gipfel F und G finden sich Citronensäure, iso-Citronensäure und Brenztraubensäure.

Vereinigt und zur Trockene eingedampft werden jeweils alle Fraktionen von Gipfel A, B; C; D,E; F,G.

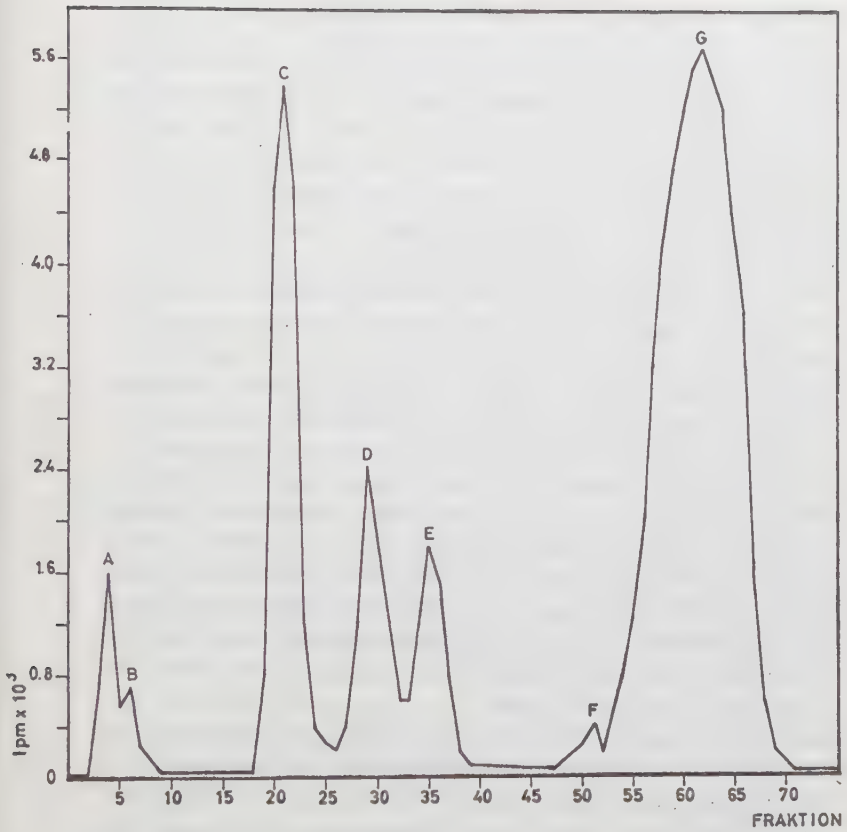


Abb.1: Chromatogramm einer Dowex1-X8(CL^-)-Säule. Die Gipfel A-G enthalten folgende Säuren: A Alanin; B unbekannte Aminosäure; C Asparaginsäure + Glutaminsäure + Essigsäure + ß-Hydroxybuttersäure; D Bernsteinsäure + Acetessigsäure; E Äpfelsäure + cis-Aconitsäure; F Zitronensäure + iso-Zitronensäure; G Brenztraubensäure.

b) Chromatographie auf Kieselgelsäulen

Für die Chromatographie auf Kieselgelsäulen gelangt eine Modifikation des Verfahrens von BULEN (47) und KINNORY (48) zur Anwendung. Die ^{14}C-markierten Säuren werden dabei durch nicht radioaktive Trägersäuren identifiziert. Alle organischen Säuren, die bei der Ionenaustauscherchromatographie nicht getrennt werden können, werden mit dieser Methode bestimmt. Eine Bestimmung der Glutaminsäure und der Asparaginsäure ist damit nicht möglich und muß mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie gesondert durchgeführt werden.

Kieselgel 100 mesh (Mallinckrodt) wird in dest. Wasser mehrmals suspendiert, und die sich langsam absetzenden Teilchen mit dem Überstand abdekantiert, bis ca. ein Drittel des Ausgangsmaterials entfernt ist. Die gröberen, rasch sedimentierten Teilchen werden abfiltriert und bei 105°C 24 Stunden lang getrocknet. Ein so vorbereitetes Kieselgel gewährleistet eine bedeutend schnellere Flußrate. Das verwendete Chloroform wird zweimal mit dest. Wasser gewaschen, mit 0,05 n Schwefelsäure gesättigt und durch Filterpapier filtriert, um noch vorhandene Wassertropfen zu entfernen.

7 g Kieselgel werden mit 4,2 ml 0,05 n Schwefelsäure vorsichtigst im Mörser zu einem feinen Pulver gemischt und mit 50 ml gewaschenem Chloroform zu einem klumpenfreien Brei verrührt. Diese Kieselgelsuspension wird nun in eine unten mit Glaswolle abgedichtete Säule von 1,2 cm Querschnitt und 30 cm Länge geschüttet. Nach Absetzen des Gels erhält man eine Säulenpackung von 16 cm Länge. Das Chloroform läßt man bis auf zwei mm über den oberen Rand der Packung abfließen. Der neutralisierten Probe (0,5ml) werden je 5µM der nicht radioaktiven Trägersäuren zugesetzt; dann wird mit 0,05 ml 3n Schwefelsäure angesäuert. Die so vorbereitete Analysenlösung mischt man in einem Zentrifugenglas mit einem Gramm wasserfreiem Kieselgel zu einem homogenen Pulver und bringt es trocken mit Hilfe eines Trichters auf die Säule. Das zugesetzte

Kieselgel verrührt man auf der Säule mit 2 ml zugegebenem Chloroform. Die Säulenfüllung bedeckt man oben mit Glaswolle, füllt 5 ml Chloroform nach und verbindet die Säule durch einen Silikonschlauch mit dem Gradientengefäß. Die Anordnung der Apparatur ist die gleiche wie bei der Ionenaustauscherchromatographie an Dowex. Das Mischgefäß enthält 250 ml gewaschenes Chloroform, das Vorratsgefäß (Scheidetrichter) n-Butanol-Chloroform im Verhältnis 60:40, dem pro 100 ml 1 ml 0,05n Schwefelsäure zugesetzt wird. Bei der Auftrennung des Gipfels F und G enthält das Mischgefäß n-Butanol-Chloroform im Verhältnis 35:65, während das Vorratsgefäß wie oben beschickt ist.
Bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 100 ml pro Stunde werden 3 ml-Fraktionen aufgefangen. Jedes Fraktionsglas versetzt man vorher mit einem ml dest. Wasser. Wie Abb.2-4 zeigt, werden 40 bzw. 60 Fraktionen aufgefangen. Nach beendetem Säulenlauf versetzt man jedes Fraktionsglas mit einem Tropfen alkoholischer Phenolrot-Lösung (0,02%) und titriert mit 0,002 n Natronlauge bis zum Farbumschlag; dabei wird zur besseren Mischung der beiden Phasen Stickstoff durch die Chloroformphase geperlt. Die organischen Säuren sind nach beendeter Titration als Natriumsalze in der wässrigen Phase gelöst. 97% der zugesetzten Säuren findet man bei der Titration wieder. Von dem so entwickelten Chromatogramm werden jeweils 0,5 ml der wässrigen Phase zur Bestimmung der Radioaktivität eingesetzt. Die Impulsrate muß unter Berücksichtigung des Titrationsvolumens gesondert berechnet werden.

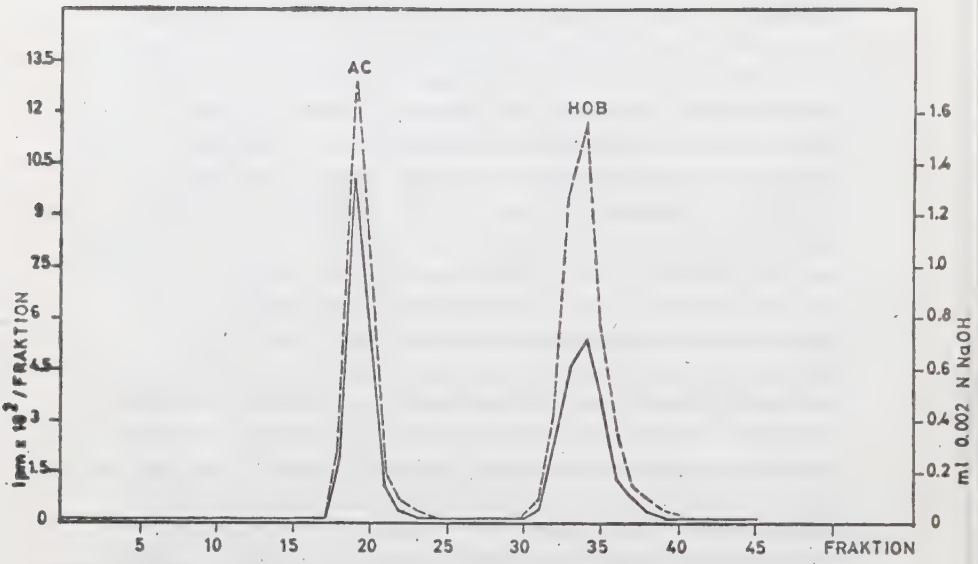


Abb.2: Kieselgelsäulenchromatogramm des auf Dowex erhältenen Gipfels C. ——— zugesetzte, nicht radioaktive Säure; ----- 14-C-markierte Säure.

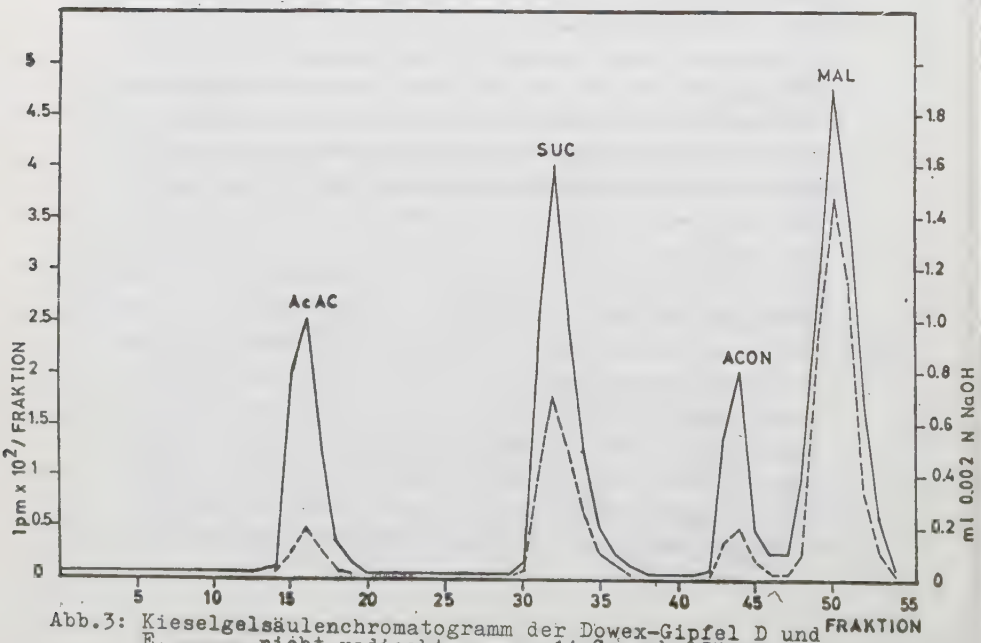


Abb.3: Kieselgelsäulenchromatogramm der Dowex-Gipfel D und E. ——— nicht radioakt., ---- 14-C-mark. Säure.

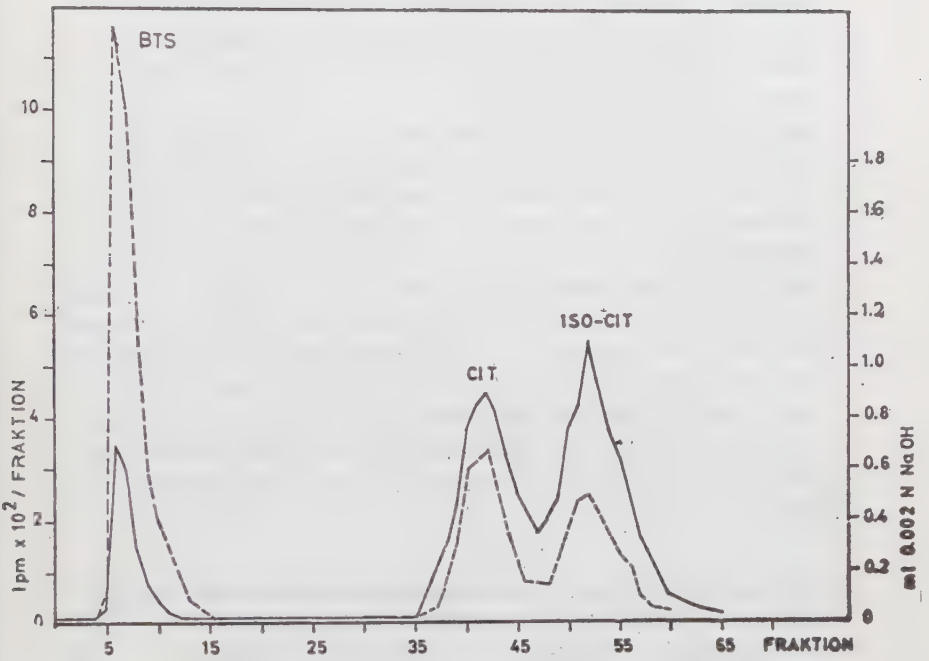


Abb.4: Kieselgelsäulenchromatogramm des Dowex-Gipfels F und G.
——— zugesetzte, nicht radioaktive Säure,
----- 14-C-markierte Säure.

c) Dünnschichtchromatographie

Die Aminosäuren Asparagin- und Glutaminsäure werden bei allen Versuchen durch Dünnschichtchromatographie der vereinigten Eluate des Gipfels C getrennt. Die Säuren des Gipfels D und E (Bernstein-, cis-Aconit- und Äpfelsäure) können auch auf Kieselgelplatten aufgetrennt werden.

Die Technik der Dünnschichtchromatographie wird wie bei STAHL (49) beschrieben ausgeführt.
Als Fließmittel hat sich für die Aminosäuretrennung

96%iger Äthanol-25%iger Ammoniak im Verhältnis 70:30, bei der Chromatographie der Zitratzyklussäuren 96%iger Äthanol-25%iger Ammoniak-dest. Wasser im Verhältnis 100:16:12 als optimal erwiesen.
Man trägt jeweils 0,05 ml Analysenlösung am Startpunkt auf. In den zahlreichen Versuchen zur Ausarbeitung der Methode wurden die Chromatogramme mit Hilfe von radioaktiven Vergleichssubstanzen und Autoradiographie der Dünnschichtplatten entwickelt. Die so lokalisierten Substanzflecken kratzt man von der Platte ab und bestimmt die Aktivität im Scintillationszähler wie später beschrieben. Auf diese Weise wird durch Bestimmung des "recovery" der aufgetragenen radioaktiven Aminosäuren die Reproduzierbarkeit der Methode geprüft. In analoger Weise wird ohne Zusatz von einer Trägersubstanz die Analyse aus den vereinigten Eluaten des entsprechenden Gipfels durchgeführt.

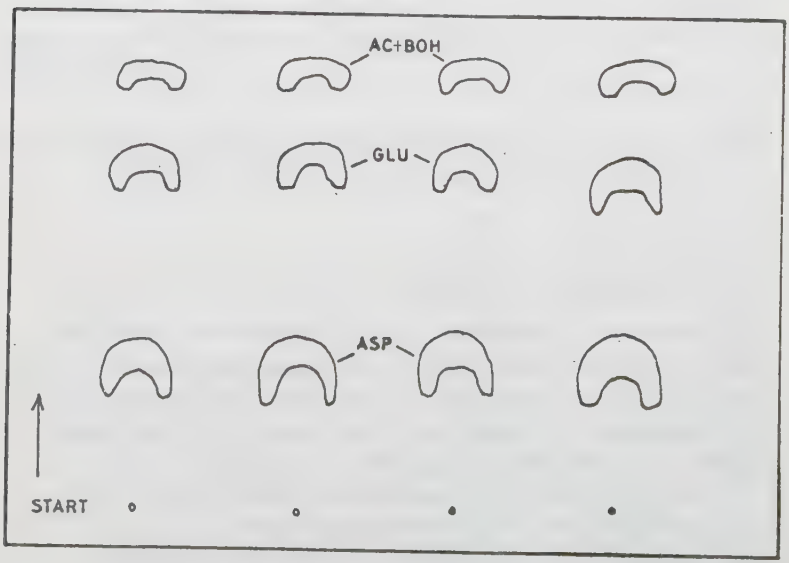


Abb.5: Autoradiogramm nach eindimensionaler Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel. Analyse der Aminosäuren im Dowex-Gipfel C.

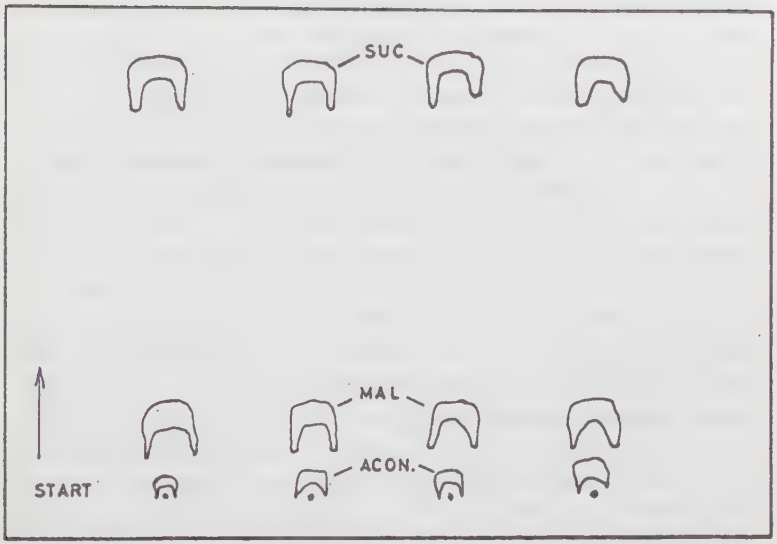


Abb. 6: Autoradiogramm nach eindimensionaler Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel. Analyse des Dowexgipfels D und E.

9. Messung der Radioaktivität

Die Bestimmung der Aktivität der einzelnen Fraktionen der Säulenchromatographie erfolgte im TRI-CARB-Flüssigkeits-scintillations-Spectrometer (Hersteller: Packard Instruments). Der verwendete Scintillator hat folgende Zusammensetzung:
7,0 g 2,5-Diphenyloxazol (PPO)
0,3 g 1,4-bis-2- (5-Phenyloxazolyl)-Benzol (POPOP)
100 g sublimiertes Naphthalin
in ungefähr 850 ml Dioxan (z.Chromatographie) gelöst und mit Dioxan auf 1000 ml aufgefüllt.
Zur Messung werden zu je 0,5 ml Aliquot einer Fraktion 15 ml Dioxan-scintillator-Lösung zugesetzt. Die Proben werden drei Stunden in der Kühltruhe des Gerätes zur

Vorkühlung aufbewahrt und anschließend die Impulsrate gezählt. Die Zähldauer beträgt für jede Probe 10 Min; jede Messung wird zwei- bis dreimal wiederholt.
Zur Messung der Aktivität in den Substanzflecken, die man bei der Dünnschichtchromatographie erhält, wird das Kieselgel abgekratzt und in ein Messglas gebracht. Nach einer von STEVENS und SNYDER (50) beschriebenen Methode füllt man das Messglas zu dreiviertel mit Thixotropic-Gel-Powder und mischt mit 15 ml Dioxan-Scintillatorlösung. Die Probe wird gut gekühlt, geschüttelt und ohne Luftblasen in der Suspension zur Messung gebracht.
Zur Messung von ^{14}C-Aktivitäten mit Dioxan-Scintillator wird die Hochspannung auf Stufe 4,7 eingestellt, was einer tatsächlichen Spannung von 1200 V entspricht. Für die ^{14}C-Aktivitätsmessung in nicht wässrigen Medien verwendet man eine Lösung der Scintillatorsubstanzen in Toluol (5 g PPO, 0,3 g POPOP in 1 l Toluol). Hierbei wird die Hochspannung des Gerätes auf Stufe 6,6 eingestellt.
Für jedes zu zählende System wird mit Hilfe eines Standards durch Variation der Spannung diejenige Einstellung ermittelt, die eine optimale Zählausbeute liefert.

Bei der ^{14}C-Aktivitätsbestimmung des $^{14}CO_2$ versetzt man die im Warburggefäß enthaltenen 0,5 ml Äthanolamin mit 3,7 ml Methanol und dieses Gemisch mit 4,3 ml Toluol-Scintillatorlösung. Die Messung erfolgt wie oben bereits beschrieben.
Zur Bestimmung der absoluten Aktivität (Zählausbeute) von ^{14}C werden nach beendeter Zählung in einige Proben 0,1 ml eines inneren Standards (^{14}C-Benzoesäure in Dioxan gelöst, 11 x 10^3 dpm/0,1 ml) zugesetzt und die Messung wiederholt. Bei der Messung mit Toluol-Scintillator wird die Ausbeute durch Zusatz von ^{14}C-Toluol bestimmt.

Die Lokalisation der Aktivität auf den Dünnschichtchromatogrammen erfolgt mit Hilfe der Autoradiographie. Die Chromatogramme werden auf STUCTURIX D 10 Röntgenfilme der Firma Gaevert aufgelegt. Es ist darauf zu achten,

daß ein möglichst enger Kontakt zwischen Röntgenfilm und Kieselgelschicht erreicht wird. Die Expositionszeiten betragen bei diesem schutzschichtlosen Film 3-6 Tage. Für die Entwicklung der Filme bewährt sich der Repro- und Dia-Entwickler "Agfa 71", der folgende Zusammensetzung hat:

5 g Metol
40 g Natriumsulfit, wasserfrei
6 g Hydrochinon
40 g Kaliumcarbonat, wasserfrei
3 g Kaliumbromid

mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.
Die Entwicklungszeit beträgt bei frisch angesetztem Entwickler 6 Minuten.

10. Bestimmung von ATP

ATP wird mit Hilfe eines enzymatischen-optischen Tests nach LAMPRECHT und TRAUTSCHOLD (51) bestimmt.

(1) Glucose + ATP $\longrightarrow$ Glucose-6-phosphat + ADP
(2) Glucose-6-Phosphat + TPN $\longrightarrow$ 6-Phosphogluconsäurelacton + TPNH + H^+

Reaktion 1 wird durch Hexokinase in Anwesenheit von Mg^{+2}-Ionen katalysiert. Die Reaktion 2 wird durch Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase katalysiert.

Testansatz:
Küvette d=2 cm; Meßstrahlung 366 nm (Photometer Eppendorf)

0,5 ml neutralisierter Perchlorsäureextrakt
3,7 ml TRA-Puffer pH 7,6
0,1 ml TPN-Lösung 10 mg/ml
0,4 ml Glucose-Lösung 100 mg/ml
0,35 ml 0,1 m $MgCL_2$-Lösung
0,02 ml G-6-PDH-Lösung 0,25 mg/ml
0,02 ml HK-Lösung o,2 mg/ml

Berechnung:

$$\frac{E.V_{Küv.}.(ml\ entn.Probe + ml\ HCLO_4 + ml\ K_2Co_3)}{3,3.d.einges.Extr..mg\ Prot.\ in\ entn.Probe} = \mu M\ ATP/mg\ Prot.$$

11. Bestimmung von ADP und AMP

Hierzu dient ebenfalls ein gekoppelter enzymatischer Test (52,53).

(1) BTS + DPNH + H^+ ⟶ MS + TPN^+

(2) ADP + PEP ⟶ BTS + ATP

(3) AMP + ATP ⟶ 2 ADP

Reaktion 1 wird von der Lactatdehydrogenase, Reaktion 2 von der Pyruvatkinase (unter Anwesenheit von Mg^{+2}- und K^+-Ionen), Reaktion 3 von der Myokinase (unter Anwesenheit von Mg^{+2}-Ionen) katalysiert.

Testansatz:
Küvette d = 1cm; Meßstrahlung 366 nm (Photom.Eppendorf)

0,5	ml	neutralisierter Perchlorsäureextrakt
2,0	ml	0,05 M TRA-Puffer pH 7,6
0,1	ml	DPNH-Lösung 6 mg/ml
0,15	ml	PEP-Lösung 5 mg/ml in 1,3 M KCL und 0,4M $MgSO_4$
0,01	ml	LDH 5 mg/ml
0,01	ml	PK 2 mg/ml
0,05	ml	ATP-Lösung 5 mg/ml
0,01	ml	MK 2 mg/ml

Die Berechnung erfolgt wie bei der ATP-Bestimmung.
Alle Enzyme wurden von der Firma C.F. Boehringer & Soehne GmbH, Mannheim bezogen.

B. Ergebnisse

1. Metabolitmuster ^{14}C-Pyruvat-oxydierender Mitochondrien in verschiedenen Funktionszuständen

Zur Bestimmung des mitochondrialen Substratmusters in definierten Stoffwechselzuständen bieten sich grundsätzlich zwei Möglichkeiten an. Die erste besteht darin, jeden der Stoffwechselzustände in einem Küvettenversuch gesondert einzustellen und zu einem geeigneten Zeitpunkt durch Enteiweißung die enzymatischen Reaktionen abzustoppen. Nach der zweiten geht man von einem größeren Reaktionsansatz aus, in welchem mit fortschreitender Zeit die Mitochondrien alle zu untersuchenden Zustände nacheinander durchlaufen. Diesem Ansatz werden jeweils im gewünschten Funktionszustand Proben zur Enteiweißung entnommen.
Während erstere Methode auch zur Darstellung von "steady-states" geeignet ist, bietet letztere den Vorteil, einzelne Metabolite während der Übergänge zwischen definierten Stoffwechselzuständen zu beobachten und damit die Dynamik der Vorgänge zu erfassen.
In den folgenden Versuchen wurde nach der zweiten Methode vorgegangen und die Proben aus einem Großansatz nach definierten Zeitintervallen entnommen. Um die Entnahmezeiten für den Hauptversuch festzulegen, mußten zunächst die einzelnen Funktionszustände in einem Vorversuch mit Hilfe der elektrochemischen Sauerstoffmessung dargestellt werden. Der Hauptversuch wurde anschließend unter absolut gleichen Bedingungen wie der Vorversuch durchgeführt.
Die Mitochondrien wurden aus drei frisch entnommenen Kaninchenherzen wie beschrieben isoliert. Der Proteingehalt der Mitochondrienstammsuspension betrug 35,4 mg/ml. Zur Prüfung der funktionellen Intaktheit der Partikel

wurden mit Hilfe der Atmungsmessung (Sauerstoffelektrode) Atmungsgröße und -kinetik mit verschiedenen Substraten - Pyruvat, Glutamat, ß-Hydroxybutyrat, Succinat - gemessen. Diese Messungen ließen klar erkennen, daß die Mitochondrienpräparation "Atmungskontrolle" durch oxydative Phosphorylierung aufwies, was als Kriterium der funktionellen Intaktheit gewertet werden kann.
Der Vorversuch, der zur Festlegung der Entnahmezeiten diente, enthielt 2,8 ml Inkubationsmedium, 0,2 ml Mitochondrienstammsuspension, 0,03 ml 3-^{14}C-Natriumpyruvat (160 µM/l Ansatz) und 0,015 ml ADP-Lösung (500 µM/l Ansatz). Die in diesem Versuch verwendete 3-^{14}C-Natriumpyruvat-Lösung hatte eine spezifische Aktivität von 1,1 mC/mM. Im Hauptversuch wurden 0,133 µC/mg Prot. eingesetzt.
Von sehr großer Bedeutung ist, daß die 3-^{14}C-Pyruvat-Lösung direkt vor Versuchsbeginn hergestellt wird, da nach VON KORFF (54) und SILVERSTEIN (55) bei längerem Stehen der Pyruvat-Lösung dieses teilweise in Parapyruvat (γ-Methyl-γ-Hydroxy-α-Ketoglutarat) übergehen kann. Da Parapyruvat nach MONTGOMERY und WEBB (56) einen Inhibitor des Zitratzyklus darstellt, wurden in allen hier beschriebenen Experimenten die verwendeten Pyruvat-Lösungen durch Chromatographie auf Dowex1-X8 (CL^-) auf Parapyruvat geprüft. Es hat sich jedoch gezeigt, daß die frisch hergestellten Pyruvat-Lösungen frei von Parapyruvat waren.
Wie Abbildung 7 zeigt, wurde der Zeitpunkt der Pyruvatzugabe als Ausgangspunkt zur Zeit Null festgesetzt. Nach drei Minuten wurde durch Zugabe von ADP der aktiv atmende Zustand erzeugt (Zustand 3). Die Atmungskurve zeigt, daß sich alle Stoffwechselzustände mit Pyruvat reproduzieren lassen. Die Endogenatmung war sehr gering, die Atmungsgeschwindigkeit änderte sich auch durch Zugabe von Pyruvat nicht (Zustand 1). Löste man aber durch Zugabe von ADP einen Phosphorylierungszyklus aus, so trat maximale Atmung ein (Zustand 3), die jedoch mit

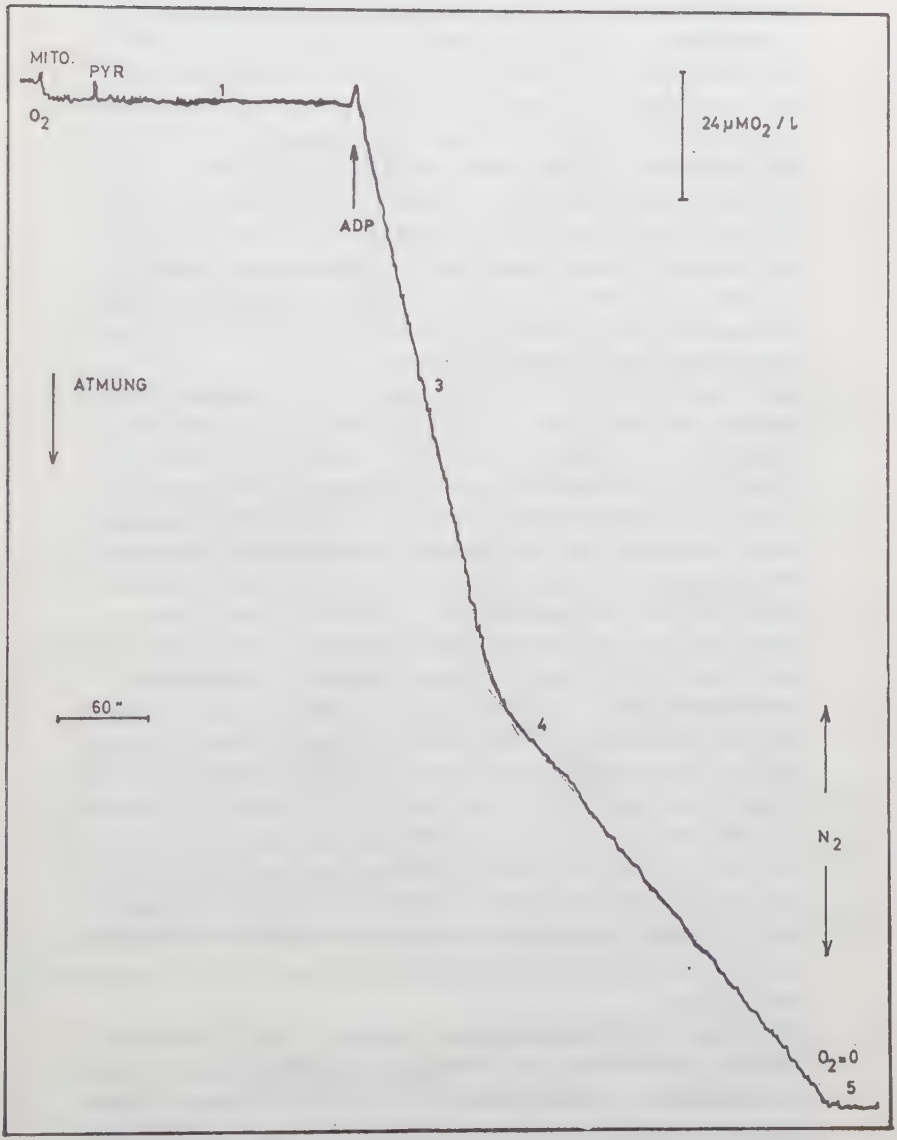


Abb.7: Polarographische Registrierung der Mitochondrienatmung. Die Zahlen an der Kurve zeigen den jeweiligen Stoffwechselzustand an.

absinkender ADP-Menge langsamer wurde (Zustand 4). Zustand 5 stellte sich bei völligem Verbrauch des gelösten Sauerstoffs ein und wurde unter Stickstoff, um Nachdiffusion von Sauerstoff aus der umgebenden Luft zu vermeiden, noch weitere 4-5 Minuten aufrechterhalten. Aus obiger Atmungskurve konnte ein genauer Zeitplan für die Entnahmen im Hauptversuch aufgestellt werden. Nach diesem Zeitplan wurden im Zustand 1 nach 30" und nach 1' Proben entnommen. Im Zustand 3 nach 3'30" und 4'. Im Zustand 4 nach 5', 6' und 8'. Im Zustand 5 nach 10' und 12', bezogen auf den Zeitpunkt "Null" der Pyruvatzugabe. Die ^{14}C-markierten Metabolite in jeder Probe wurden wie beschrieben bestimmt.

Abbildung 8 zeigt die Veränderungen des gesamten Substratmusters während dieses Versuchs. Wie in der Abbildung dargestellt, findet im Zustand 1 zunächst ein steiler Abfall der Pyruvat-Aktivität statt, der aber gegen Ende dieses Zustandes wieder flacher verläuft. Da Pyruvat auch unabhängig von der Atmung verschiedene Reaktionen eingehen kann, findet sich bereits zu diesem Zeitpunkt Aktivität im ß-Hydroxybutyrat, Alanin, Zitrat und im Malat wieder. Im aktiv atmenden Zustand, nach ADP-Zusatz, setzt mit der Atmung eine sehr starke Kohlendioxydentwicklung und ein ebenso rascher Abfall von Pyruvat ein. Mit Ausnahme des Acetats zeigen alle anderen Metaboliten im Zustand 3 gegenüber Zustand 1 einen mehr oder weniger starken Aktivitätszuwachs. Im Zustand 4 (kontrollierter Zustand, relativer ADP-Mangel) fällt die Aktivität bis auf den Wert Null, während das Kohlendioxyd hier maximale Aktivität erreicht hat. Das zugesetzte Pyruvat war in diesem Experiment zufällig zum gleichen Zeitpunkt wie der im Medium gelöste Sauerstoff durch die Mitochondrien verbraucht.

Unter anaeroben Bedingungen (Zustand 5) und teilweise bereits im kontrolliert atmenden Zustand 4 zeigten sich alternierende Veränderungen der Substrate Alanin, Asparaginsäure und ß-Hydroxybuttersäure. Dieser auffallende

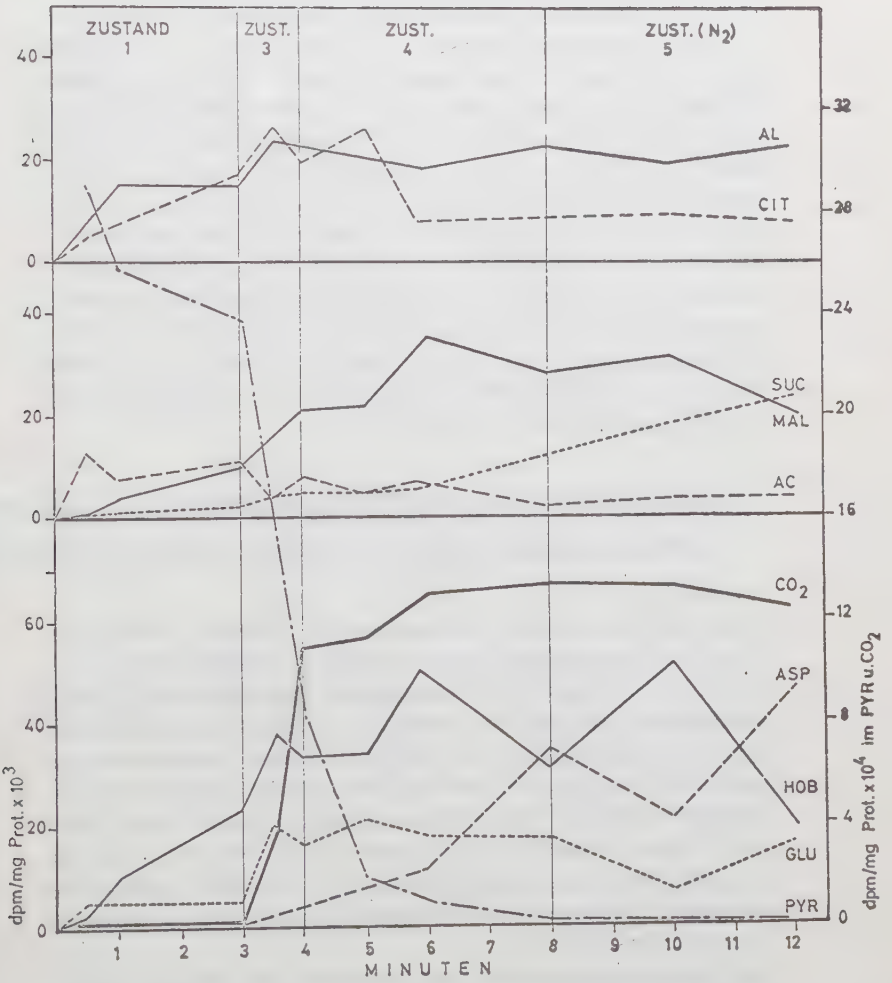


Abb.8: ^{14}C-Aktivitäten aller bestimmten Metaboliten während der Oxydation von 3-14C-Pyruvat durch Herzmitochondrien.

und erstmalig erhobene Befund kann als Hinweis für mögliche metabolische Oscillationen angesehen werden, wie sie unter anderem an anaeroben Suspensionen oder Extrakten von Hefezellen beobachtet wurden (57,58). Eine nähere Untersuchung dieses Phänomens war Gegenstand der weiteren Experimente. Der größte Teil der aus Pyruvat entstandenen Essigsäure dürfte, wie eine Nachprüfung zeigte, durch einen methodischen Fehler (zu niedriger pH) bei der Aufarbeitung der Proben verloren gegangen sein. Dennoch kann aus den Bestimmungen die eingeschränkte Aussage gewonnen werden, daß offensichtlich mit Eintritt der aktiven Atmung (Zustand 3) der Acetat-Spiegel sinkt. Dies steht im Einklang mit den weiteren Experimenten, welche zeigen, daß Acetat akkumuliert, solange die Atmung sich im kontrollierten Zustand befindet.

5. Mitochondriale Metabolitmuster während der [illegible] Oxydation unter besonderer Berücksichtigung der aktiven Phase

In der folgenden Untersuchung wurden ebenfalls Mitochondrien des Kaninchenherzens verwendet, deren Funktionstüchtigkeit durch elektrochemische Atmungsmessung und synchron dazu durch Bestimmung des Reduktionsverhaltens der Pyridinnucleotide mit Hilfe der Fluorescenzmessung geprüft wurde. Die Mitochondrien zeigten ausgezeichnete Atmungskontrolle über mehrere Stunden, wobei neben Pyruvat, Glutamat und Succinat auch Fettsäuren als Substrat eingesetzt wurden. In Gegenwart von Carnitin wiesen die Mitochondrien auch mit Fettsäuren hohe Atmungsaktivität und Atmungskontrolle auf.

Die Wiederholung des obigen Versuchs, bei welchem eine Mitochondriensuspension mehrere Funktionsstadien der oxydativen Phosphorylierung durchläuft, sollte einerseits dem Nachweis der Reproduzierbarkeit dienen und andererseits eine längere Beobachtungsdauer im anaeroben umfassen, um die zunächst auffallenden alternierenden Veränderungen

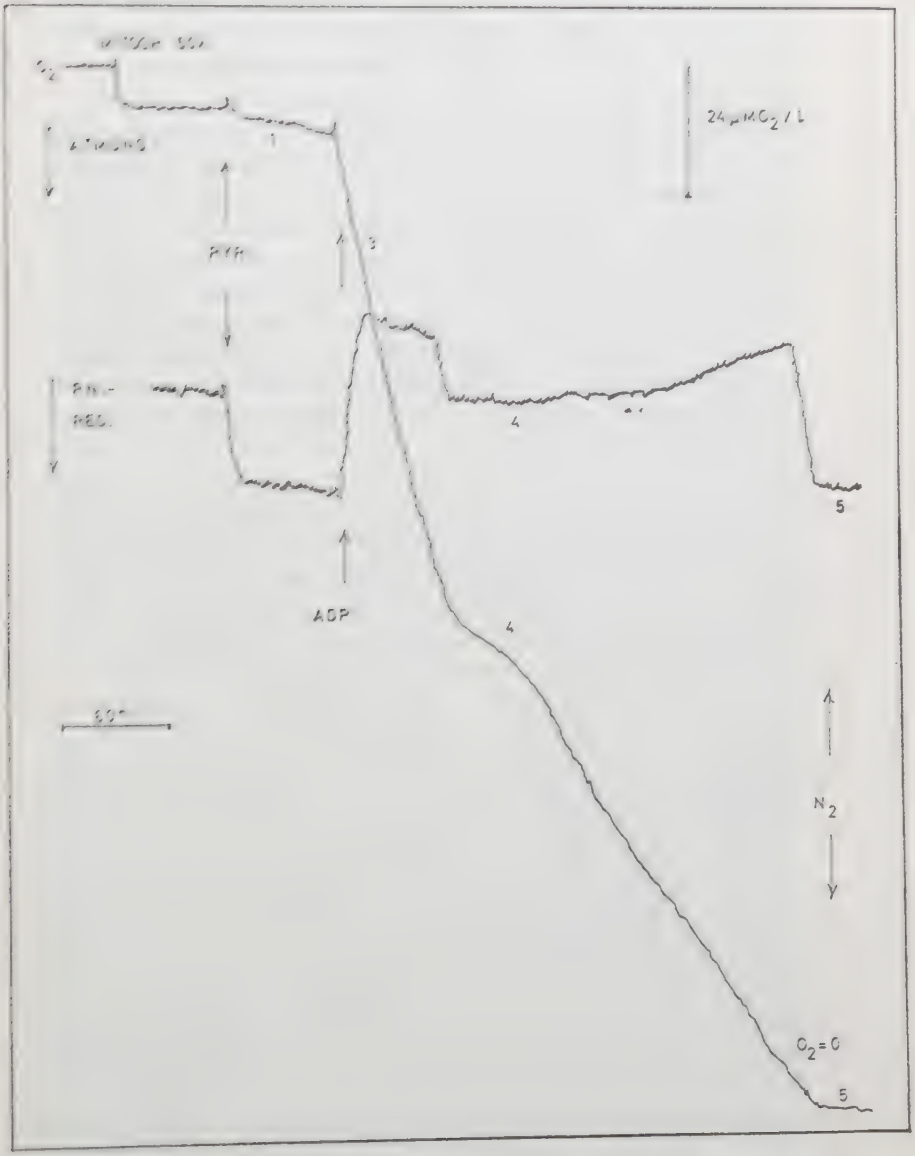


Abb.9: Darstellung der Stoffwechselzustände durch die Atmung und den Reduktionsgrad der Pyridinnucleotide

eingehender zu studieren. Sollten sich Oszillationen in ausgeprägter Form wiederholen und darstellen lassen, so könnte man daraus eventuell Rückschlüsse auf mitochondriale regulatorische Mechanismen ziehen.
Im vorhergehenden Versuch war das zugesetzte Pyruvat genau zu dem Zeitpunkt verbraucht wie der im Inkubationsmedium gelöste Sauerstoff. Der anaerobe Zustand trat also ohne Überschuß an Pyruvat ein. Um obige Versuchsbedingung einzuhalten, wurde in diesem Experiment zunächst die Pyruvatmenge genau ausgetestet, deren vollständige Oxydation durch die Mitochondrien einen Atmungsvorgang auslöst, der gerade die Menge an Sauerstoff benötigt, welche im Inkubationsmedium bei 28°C physikalisch gelöst ist. Möglicherweise liegt darin eine Grundbedingung für die beobachteten Oszillationen.
Die Durchführung dieses Tests geschieht relativ einfach durch gleichzeitige Registrierung der Atmung und der Fluoreszenz der Pyridinnucleotide nach Zusatz von ADP und Pyruvat zu den Mitochondrien. Dabei stellt die Fluoreszenzmessung einen besonders empfindlichen Indikator dar. Ist gemäß den gewählten Voraussetzungen ein Überschuß an Pyruvat vorhanden, so zeigen die Mitochondrien nach Phosphorylierung der ADP eine gleichbleibende Atmung im Zustand 4 bis zum völligen Verbrauch des Sauerstoffs (Atmung= 0). Die Pyridinnucleotide weisen dabei nach einem Phosphorylierungszyklus (Oxydation-Reduktion) einen relativ hohen Reduktionsgrad auf und werden bei Eintritt der Anaerobiose noch weiter reduziert (Zustand 5). Ist zu wenig Substrat vorhanden, d.h. alles Pyruvat vor Verbrauch des Sauerstoffs oxydiert, so kommt die Atmung völlig zum Erliegen. Daß dies nicht auf eine Atmungshemmung sondern auf akuten Substratmangel zurückzuführen ist, drückt sich in der gleichzeitig eintretenden, fast völligen Oxydation der Pyridinnucleotide aus (Zust.2). Die nach den gewählten Voraussetzungen geforderten Bedingungen sind im Experiment der Abbildung 9 optimal erfüllt.

Der Vorversuch enthielt 2,9 ml Inkubationsmedium, 0,05 ml Mitochondrienstammsuspension (54 mg Prot./ml Susp.), 0,03 ml 3-^{14}C-Pyruvat-Lösung (110µM/l Ansatz) und 0,02 ml ADP-Lösung (612µM/l Ansatz).
Abbildung 9 zeigt die Aufzeichnung der Atmung und des jeweiligen Reduktionsgrades der Pyridinnucleotide. Mit Auslösung der aktiven Atmung gehen die Pyridinnucleotide in einen relativ oxydierten Zustand über. Im Zustand 4 (kontrollierte Atmung) wird der anfängliche Reduktionsgrad auf Grund der relativ geringen Substratkonzentration nicht wieder erreicht. Kurz vor Eintritt der Anaerobiose beginnt eine langsame Oxydation der Pyridinnucleotide, entsprechend dem Abfall von Pyruvat gegen Null kurz vor Verbrauch des Sauerstoffs. Der im Zustand 5 sich dann einstellende Reduktionsgrad der Pyridinnucleotide stellt nicht die maximale Reduktion dar.

Zeit Min.	Zusatz µM/l	Succ. dpm/mg	Mal. Protein	HOB x 10^{-3}	Glut.	Asp.	Zust.
0	110 Pyr.	-	-	-	-	-	1
1'	612 ADP	1,4	7,0	10,5	3,2	1,7	3
1'45"		3,4	7,6	14,2	3,3	2,8	
2'		7,3	8,5	18,9	5,8	6,4	
3'		7,5	12,5	21,7	7,2	8,6	4
5'	N_2	11,6	23,4	27,6	13,3	12,2	5
7'		9,0	35,9	38,2	13,4	13,8	
9'		23,3	13,9	49,8	13,9	13,9	
11'		29,2	15,1	39,2	16,4	17,8	
13'		16,8	26,7	43,5	10,8	12,3	
15'		22,8	14,7	34,9	14,9	23,9	

Tab. 2: ^{14}C-Aktivitäten oszillierender Substrate während der Oxydation von 3-^{14}C-Pyruvat durch Mitochondrien.

Aus der Sauerstoffkurve der Abbildung 9 wurde wie oben der Zeitplan für die Durchführung des Hauptexperimentes entnommen. Die Abnahmezeiten wurden so gelegt, daß eine größere Anzahl von Proben im anaeroben Zustand entnommen werden konnte. Das im Vor- und Hauptversuch verwendete 3-^{14}C-Pyruvat hat eine spezifische Aktivität von 2,07 mC/mM. Dem Hauptversuch wurden 0,344 C 3-^{14}C-Pyruvat zugesetzt. Die Entnahmezeiten sind in Tabelle 2 aufgeführt. Tabelle 2 gibt nur einen Teil der bestimmten Substrate wieder, wobei diejenigen Substrate aufgeführt sind, welche an der nun einwandfrei nachgewiesenen Oszillation teilnehmen. Das gesamte Substratmuster ist in Abbildung 10 dargestellt.

Wie Abbildung 10 zeigt, finden sich schon nach kurzer Zeit erhebliche Mengen von Aktivität im Acetat und im ß-Hydroxybutyrat (HOB); dabei ist die Atmung zunächst gering, entsprechend der sehr geringen Kohlendioxydentwicklung. Daneben bildet sich eine kleine Menge Alanin, das im weiteren Verlauf des Versuches nur wenig ansteigt. Während des aktiv atmenden Zustandes setzt eine rasche Kohlendioxydentwicklung, sowie eine entsprechende Abnahme an Pyruvat ein. Dabei ist der Zuwachs von Aktivität im Acetat und ß-Hydroxybutyrat verlangsamt. Erst nach Verbrauch des Phosphatakzeptors, also im Zustand 4 setzt sich der Anstieg von Acetat fort, das jetzt in geringem Maße via Zitratzyklus oxydiert wird. Zugleich steigen auch Malat und insbesondere ß-Hydroxybutyrat beschleunigt an. Die Bildung von ß-Hydroxybutyrat hält auch noch nach Verbrauch des Sauerstoffs an, wobei die Aktivität im Acetat bis unter den Ausgangswert im Zustand 1 sinkt. Hierin zeigt sich eindeutig, daß Mitochondrien des Herzmuskels in der Lage sind "Acetonkörper" aus C_2-Einheiten über Acetyl-CoA zu bilden.

Bis zu diesem Reaktionsstadium zeichnet sich ein etwa stetiger Anstieg von Glutamat und Aspartat ab, wobei die Aktivität der beiden durch eine Transaminierung gekoppelten Aminosäuren einen nahezu gleichen "steady state"

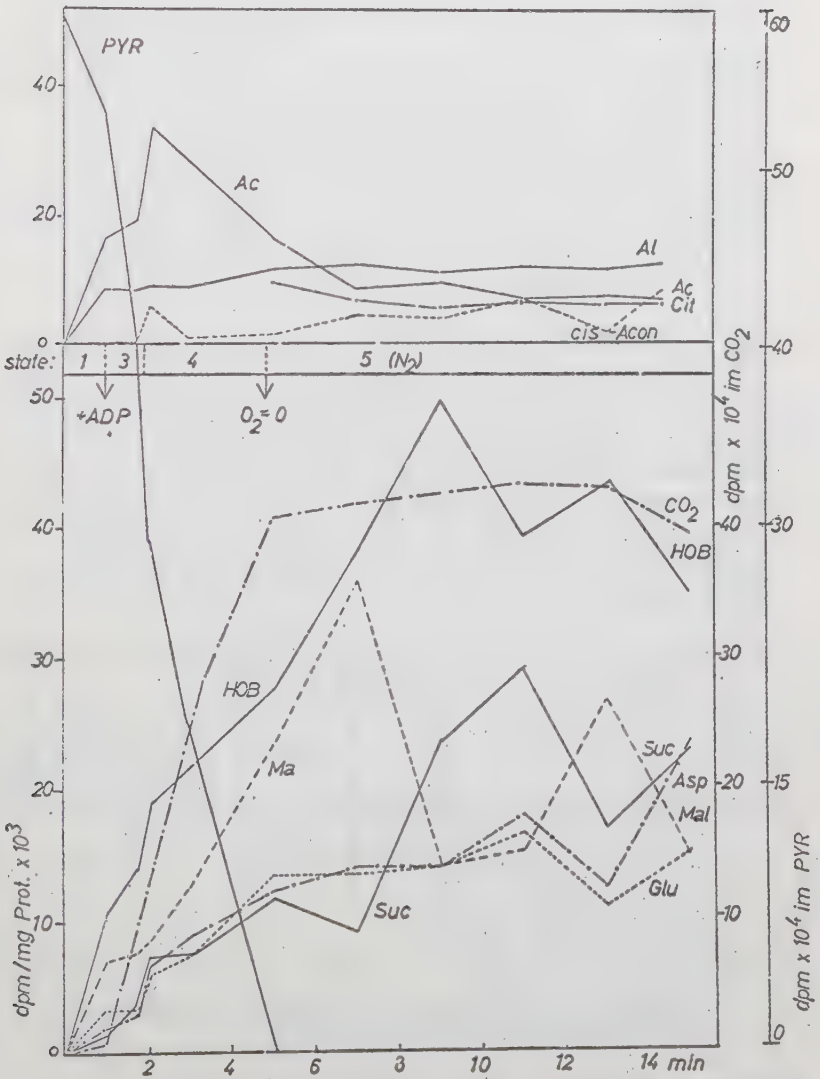


Abb.10: ^{14}C-Ativitäten aller bestimmten Metabolite während der Oxydation von 3-^{14}C-Pyruvat im Aeroben und Anaeroben.

erreichen. Hieraus und aus den späteren parallelen Veränderungen beider Substrate kann geschlossen werden, daß sich diese enzymatische Reaktion unabhängig vom Funktionszustand der Mitochondrien weitgehend im Gleichgewicht befindet.
Mit Eintritt des anaeroben Zustandes kann, wie im vorhergehenden Experiment, eine oszillierende Verschiebung der Aktivität im Succinat, Malat, ß-Hydroxybutyrat, Glutamat, Aspartat und zu einem geringen Teil auch im Alanin beobachtet werden. In der eingependelten Oszillation schwingen Malat und ß-Hydroxybutyrat in Phase gegen Succinat, Aspartat und Glutamat. Dem geht eine Phasenumkehr zwischen ß-Hydroxybutyrat und dem Paar Succinat/Malat voraus.

Als Hauptergebnis zeigt dieser Versuch, daß sich die zuerst gewonnenen Befunde reproduzieren lassen und daß verschiedene Substrate, wie oben angedeutet, an Oszillationen teilnehmen. Da die oszillatorischen Veränderungen besonders interessieren, muß festgestellt werden, ob alle Substrate, die an Oszillationen teilnehmen, erfaßt wurden und ob ein ursächlicher Zusammenhang zwischen diesen besteht. Sofern dies der Fall ist, müßten alle ab- und zunehmenden Aktivitäten zu einem bestimmten Entnahmezeitpunkt gleich sein. Inwieweit diese Bilanz aufgeht, zeigt Tabelle 3.

Zeitintervall (Minuten)	^{14}C-Aktivität: dpm x 10^{-3}/mg Protein						
	Succ.	Mal.	HOB	Glu.	Asp.	Summe der zunehmenden Imp.	Summe der abnehmenden Imp.
7- 9	+14,35	-22,01	+11,58	+ 0,5	+ 0,1	26,53	22,01
9-11	+ 5,74	+ 1,17	-10,53	+ 3,5	+ 3,9	14,29	10,5
11-13	-12,24	+11,65	+ 4,26	- 5,6	- 5,4	15,91	24,24
13-15	+ 6,01	-12,06	- 8,63	+ 4,1	+10,9	21,11	20,69

Tab. 3: Wechsel der ^{14}C-Aktivität der mitochondrialen Substrate während der Anaerobiose.

Größenordnungsmäßig stimmt sie in zwei Fällen gut überein, in anderen zeigt sich eine erhebliche Differenz, welche darauf hinweist, daß ein oder mehrere Metabolite nicht analytisch erfaßt werden. Dabei ist vor allem an Oxalacetat, ∝-Ketoglutarat und Acetoacetat zu denken, deren Bestimmung gewissen Schwierigkeiten unterliegt. Im Zusammenhang mit dieser Bilanz ist es auch von Bedeutung, die Summe der ^{14}C-Aktivitäten aller bestimmten Metabolite der eingesetzten Aktivität im 3-^{14}C-Pyruvat für jeden Entnahmezeitpunkt gegenüberzustellen. Tabelle 4 zeigt diese Gegenüberstellung. Es ist nicht zu erwarten, daß alle Substrate, die Aktivität aufnehmen, wiedergefunden werden. Jedoch zeigen die hohen %-Werte des "Recovery", daß der größte Teil dieser Substrate erfaßt wird.

Entnahmezeiten	14-C-Aktivität: dpm x 10^{-4}/2 ml Entnahme		
	14-C-Aktivität in allen Metaboliten und im CO_2	14-C-Aktivität im zugesetzten 3-14-C-Pyruvat	% der wiedergefundenen 14-C-Aktivität
1'	108,38	112,24	96,6
5'	98,73	"	88,0
7'	101,69	"	90,5
11'	105,67	"	94,0
13'	102,78	"	91,5
15'	97,83	"	87,0

Tab. 4: Recovery der 14-C-Aktivität.

Zur nochmaligen Sicherung der ablaufenden Oszillationen wurden in einem weiteren Versuch, der unter den gleichen Bedingungen wie das obige Experiment durchgeführt wurde, einzelne Substrate, die Oszillation gezeigt hatten, nochmals bestimmt. In diesem Versuch wurden 0,416µC 3-^{14}C-Pyruvat pro mg Protein eingesetzt. Abbildung 11 zeigt das Verhalten der ^{14}C-markierten Substrate Asparaginsäure, Glutaminsäure und Bernsteinsäure während aller beobachteten Stoffwechselzustände. Eine Erfassung des gesamten Substratmusters schien wegen des großen experimentellen Aufwandes nicht mehr angebracht. Da das metabolische Verhalten dieser drei Substrate mit dem der obigen Experimente prinzipiell übereinstimmt, erübrigt sich eine weitere Besprechung der Befunde.

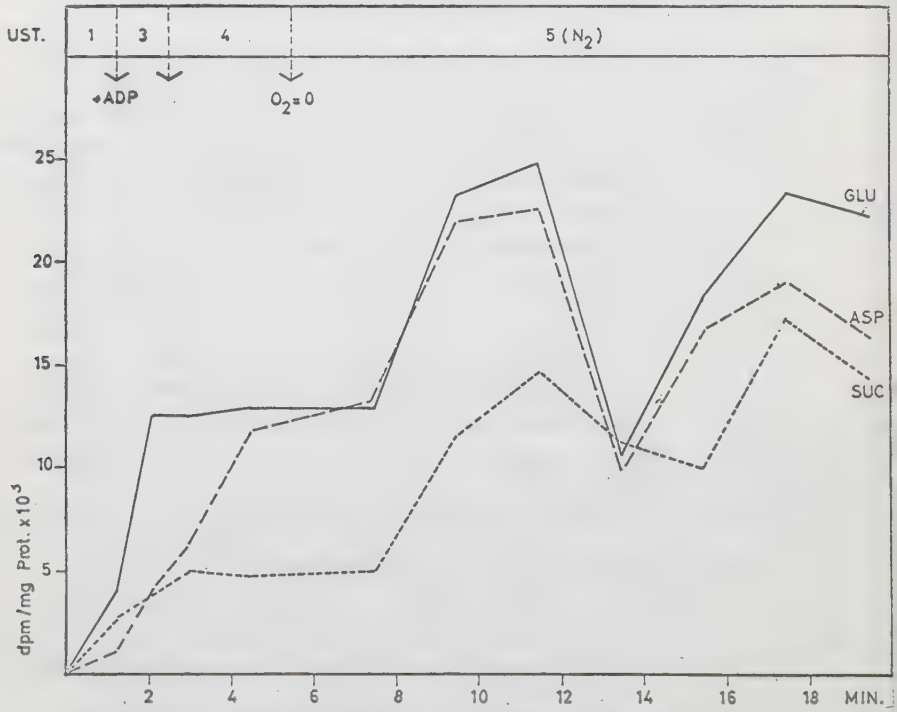


Abb. 11: 14-C-Aktivitäten von Glutamin-, Asparagin- und Bernsteinsäure während der Oxydation von 3-14C-Pyruvat durch Herzmitochondrien.

Als auffallende Verschiedenheit gegenüber den vorhergehenden Experimenten sei herausgestellt, daß hier die Differenz zwischen Asparaginsäure und Glutaminsäure im aeroben Teil des Experimentes größer ist, als vorher beobachtet wurde und daß im anaeroben Teil hier die im Glutamat gefundene Aktivität höher als die des Aspartat liegt, also genau umgekehrt als früher beschrieben.

3. Verhalten von Adeninnucleotiden in verschiedenen Funktionszuständen Pyruvat-oxydierender Herzmitochondrien

Die Regulation der mitochondrialen Atmung hängt vom Verhältnis ATP zu ADP + P_a ab, wie im Kapitel über Atmungskontrolle einführend dargestellt wurde. In den folgenden Versuchen wird das Verhalten der Adeninnucleotide ATP, ADP und AMP während der Oxydation von Pyruvat untersucht. Daher wird eine längere Beobachtung während der anaeroben Phase einbezogen, um die Teilnahme an eventuell ablaufenden Oszillationen zu studieren.
Es wurden vier Versuche unter den gleichen Versuchsbedingungen, analog der Bestimmung der organischen Säuren, durchgeführt. Die Stoffwechselzustände wurden mit Hilfe der elektrochemischen Atmungsmessung und durch die Registrierung des Reduktionsgrades der Pyridinnucleotide festgelegt. Die Pyruvatkonzentration wurde auch hier so eingestellt, daß mit völligem Verbrauch des gelösten Sauerstoffs auch das zugesetzte Pyruvat oxydiert war. Die Ergebnisse dieser Versuche sind aus den Abbildungen 12-15 ersichtlich.
Bei Zusatz von ADP wird dieses im aktiv atmenden Zustand durch die oxydative Phosphorylierung sofort in ATP übergeführt. ADP fällt also sehr schnell ab, während ATP um denselben Betrag ansteigt. Im Zustand 4 findet gemäß der geringeren Atmung nur noch ein geringerer Anstieg bzw. Abfall von ADP statt. Mit Eintritt der Anaerobiose fällt ATP ab; dies ist eine Folge der hohen ATP-ase-Aktivität

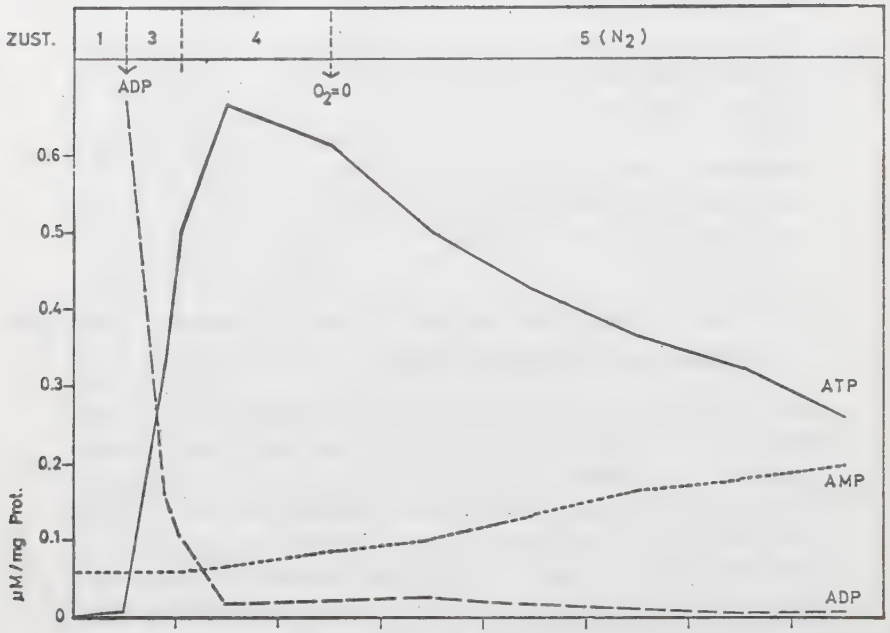

ZUST.
1
3
4
5 (N_2)
ADP
O_2=0
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
µM / mg Prot.
ATP
AMP
ADP
2
4
6
8
10
12
14
MIN.

ABB. 12

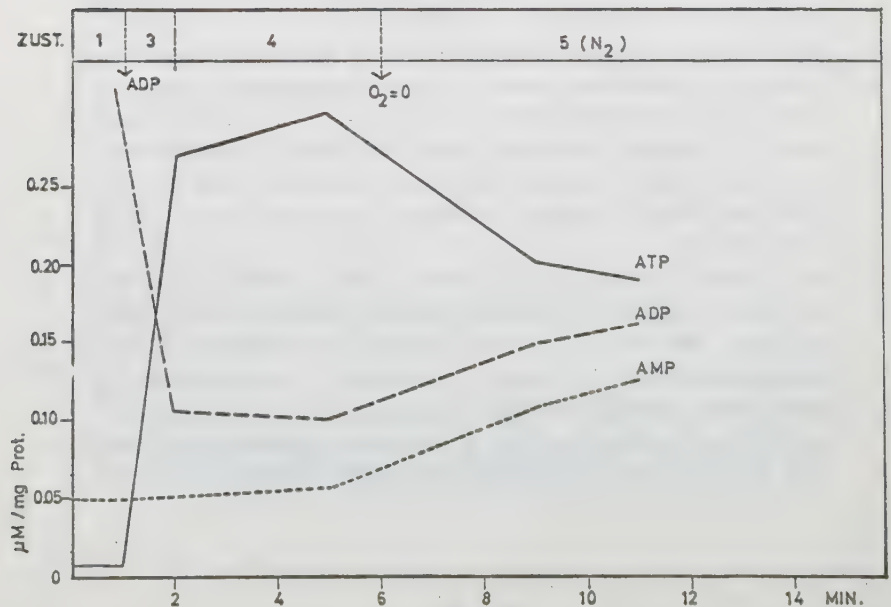

ZUST.
1
3
4
5 (N_2)
ADP
O_2=0
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0
µM / mg Prot.
ATP
ADP
AMP
2
4
6
8
10
12
14
MIN.

ABB. 13

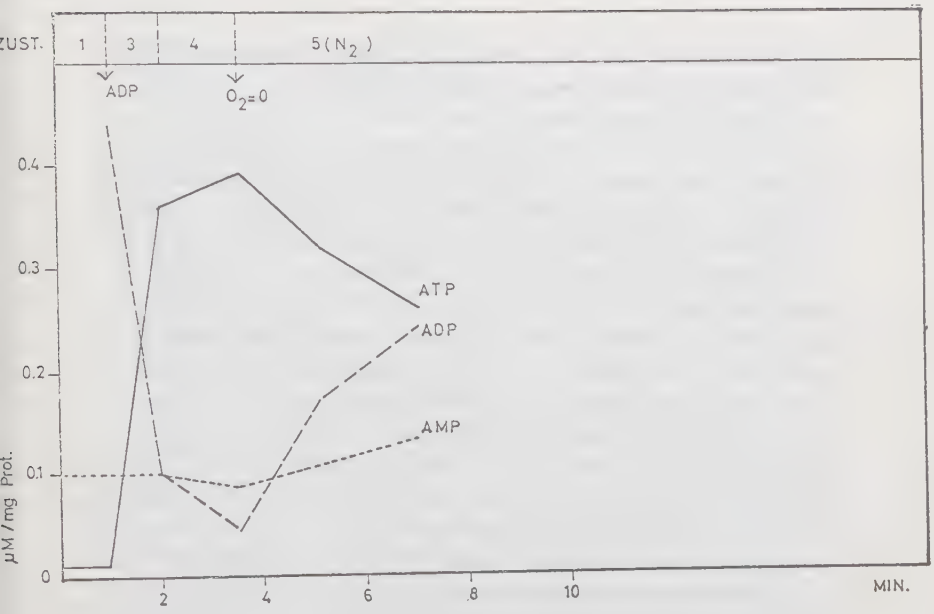

ZUST.
1
3
4
5 (N_2)
ADP
O_2=0
0.4
0.3
0.2
0.1
0
µM / mg Prot.
ATP
ADP
AMP
2
4
6
8
10
MIN.

ABB. 14

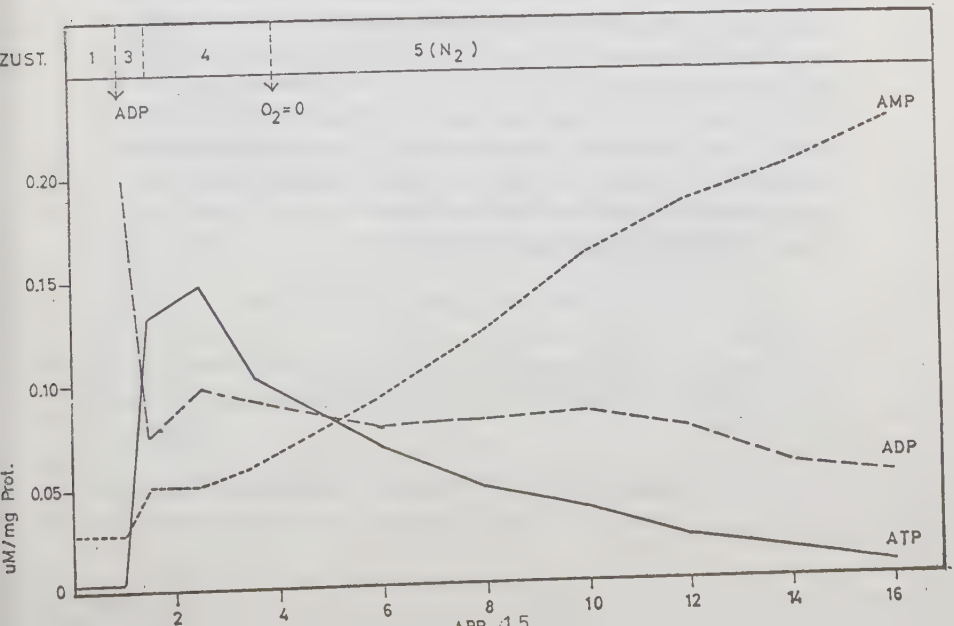

ZUST.
1
3
4
5 (N_2)
ADP
O_2=0
AMP
0.20
0.15
0.10
0.05
0
uM/mg Prot.
ADP
ATP
2
4
6
8
10
12
14
16

ABB. 15

der Sarcosomen. Wie der Versuch, dessen Ergebnisse in Abbildung 15 dargestellt werden, zeigt, kann der Abfall des ATP bereits in der aeroben Phase einsetzen. Dies ist der Fall, wenn das zugesetzte Substrat bereits vor Eintritt des anaeroben Zustandes völlig oxydiert wurde. In diesem einen Experiment wurde nur die Hälfte der sonst üblichen Substratmenge pro mg Protein eingesetzt. Gleichzeitig mit dem Abfall von ATP in der anaeroben Phase steigen ADP und AMP an. Da die drei Nucleotide durch das Enzym Myokinase (Adenylatkinase) gekoppelt sind, wird ein Abfall von ATP im anaeroben Zustand jeweils durch den Anstieg der Summe von ADP und AMP beantwortet. Im Falle einer sehr hohen Myokinase-Aktivität der Mitochondrien besteht die Möglichkeit, daß bei Abfall des ATP der Spiegel des ADP über längere Zeit fast gleich bleibt, und statt dessen das AMP um so mehr ansteigt, wie zum Beispiel in Abbildung 15 dargestellt ist.

Die Experimente haben gezeigt, daß bei Stillstand der Atmung infolge der Anaerobiose oder Substratmangel das vorher gebildete ATP infolge der ATP-aseaktivität rasch in ADP und AMP übergeführt wird. In dem durch die Atmungs- und Fluoreszenzmessung festgelegten Stoffwechselzustand 3 findet die ATP-Synthese aus ADP und anorganischem Phosphat mit hoher Geschwindigkeit statt. Oszillatorische Veränderungen der Adeninnucleotide in der anaeroben Phase konnten nicht nachgewiesen werden. Ein Hinweis auf den etwaigen Zusammenhang des Adeninnucleotidsystems mit den metabolischen Oszillationen war daher nicht nachzuweisen.

IV DIKUSSION

Durch eine große Zahl von Arbeiten wurde nachgewiesen, daß die Stoffwechselaktivität von isolierten Mitochondrien bei ausreichendem Substratangebot im wesentlichen durch das Verhältnis von Adeninnucleotiden und anorganischem Phosphat kontrolliert wird (29,32,35). Dieser Zusammenhang von mitochondrialer Atmung und energiereichen Phosphaten drückt sich, wie eingangs erwähnt, im Auftreten der einzelnen nach CHANCE (35) definierten Stoffwechselzustände aus. Wie in den Arbeiten von KLINGENBERG (59,60,61) gezeigt wurde, sind die Vorgänge des Elektronentransportes und der damit gekoppelten oxydativen Phosphorylierung reversibel. Mitochondrien verfügen demnach über einen Regulationsmechanismus, dessen Funktionieren eine Steuerung aller oxydativen, mit der Atmungskette direkt verknüpften Reaktionen wahrscheinlich macht. Den verschiedenen respiratorischen Funktionszuständen von Mitochondrien, denen definierte Redoxzustände des DPN-Systems entsprechen, sollten also auch definierte metabolische Zustände auf der Ebene der Substrate zugeordnet sein. Diese Forderung erstreckt sich nicht ausschließlich auf Substrate, die in DPN-abhängigen Redoxreaktionen umgesetzt werden, sondern schließt auch DPN-unabhängige Metabolitgleichgewichte ein, sofern deren Reaktionspartner in DPN- oder TPN-abhängigen Reaktionen weiter reagieren können. Dies gilt vor allem für Aminosäuren, welche zum Beispiel an Transaminierungen oder Dehydrogenase-Reaktionen beteiligt sein können. In den vorliegenden Untersuchungen betrifft dies speziell Glutaminsäure, Asparaginsäure und Alanin, deren Reaktionsprodukte bei Reduktion oder Transaminierung Glieder der Endoxydation bzw. des Citratzyklus darstellen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, eine Gegenüberstellung der respiratorischen Zustände und der diesen

Zuständen entsprechenden Metabolitmuster in Herzmitochondrien. Solche Experimente sind geeignet, Kontrollmechanismen ausfindig zu machen. Besonders interessiert das Problem, durch welche Mechanismen die Aktivität des Citronensäurezyklus und dessen Substratdurchsatz kontrolliert wird. Diese Frage ist bis heute nicht beantwortet, hat aber große physiologische Bedeutung. Zum Beispiel im Falle eines Diabetes mellitus, wo durch Hemmung des Citronensäurezyklus durch langkettige Fettsäuren die Bildung von Citrat gehemmt sein soll (62) und damit beim Abbau der Fettsäuren eine Anhäufung von Acetyl-CoA, wie sie von WIELAND nachgewiesen wurde, stattfindet. Somit wird die Bildung von Acetonkörpern (ß-Hydroxybuttersäure, Acetacetat, Aceton) begünstigt. Wie aus den durchgeführten Experimenten klar hervorgeht, muß zunächst zwischen zwei Beobachtungsabschnitten unterschieden werden. Dies sind einerseits die Vorgänge im aeroben Stoffwechselzustand, andererseits die oszillatorischen Reaktionen im anaeroben Zustand der Mitochondrien.

Die Untersuchungen haben gezeigt, daß bei Zuführung von radioaktivem Pyruvat alle analysierten Metabolite des Citronensäurezyklus sowie die Metabolite der "Nebenwege" rasch Radioaktivität aufnehmen. Solange kein Phosphatakzeptor (ADP) zugesetzt wird, ist auch die Atmung der Mitochondrien minimal, d.h. es erscheint nur eine geringe Aktivität des Citronensäurezyklus. Während dieser Zeit kann eine rasche Bildung von Acetat (C_2-Körper) nachgewiesen werden. Gleichzeitig häuft sich die Radioaktivität im ß-Hydroxybutyrat (C_4-Körper) stark an; dies bedeutet, daß in diesem Stadium eine erhebliche Nettobildung von Acetonkörpern (C_4-Körper) über Acetyl-CoA möglich ist.

Erzeugt man durch Zusatz von Phosphatakzeptor (ADP) den Zustand der aktiven Atmung, so wird Acetat (C_2-Körper) nicht mehr in diesen Reaktionsweg gedrängt,

sondern vor allem durch den nunmehr mit hoher Umsatzrate ablaufenden Citronensäurezyklus verbraucht. Während dieses Stadiums findet sich ein minimaler Zuwachs von Radioaktivität im Acetat, dagegen ein hoher Verbrauch von Pyruvat sowie eine erhebliche Kohlendioxydbildung. Gleichzeitig ist auch der Zuwachs an ß-Hydroxybutyrat verlangsamt. Sobald nach Verbrauch des ADP erneut ein Zustand inhibierter Atmung vorliegt, wird Acetat wieder beschleunigt zu C_4-Körpern umgewandelt, was sich in dem raschen Anstieg von ß-Hydroxybutyrat ausdrückt. Der Zuwachs an Radioaktivität im Acetat und im ß-Hydroxybutyrat verläuft also nahezu parallel. Zugleich zeigen die Ergebnisse, daß eine Bildung von Acetonkörpern, in dem Fall durch ß-Hydroxybutyrat repräsentiert, mit einer geringen Aktivität des Citronensäurezyklus einhergeht. Stellt man sich unter physiologischen Bedingungen eine kontinuierliche Bildung von Pyruvat durch glykolytischen Glucose-Abbau vor, so ist verständlich, daß bei gehemmter Endoxydation (Citratzyklus) Pyruvat in die Nebenwege des Citratzyklus gedrängt wird, also eine Bildung von Acetonkörpern (ß-Hydroxybutyrat), Alanin oder auch Malat (malic-enzyme) (63) stattfindet. Auch diese Substrate nehmen in der ersten Phase der dargestellten Versuche stark zu.

Weiterhin ist das Verhalten des Substratpaars Succinat/Malat von Interesse. Wie bei den übrigen Substraten ist der Zuwachs von Radioaktivität auch für diese Substrate im Zustand der aktiven Atmung gegenüber dem kontrollierten Zustand vermindert. Betrachtet man aber nicht die absolute gefundene Radioaktivität dieser Substrate während dieses Stoffwechselzustandes, sondern den Zuwachs an Radioaktivität pro Zeiteinheit (Inkremente), so zeigt sich, daß hier ein sogenannter "cross-over" von Succinat und Malat auftritt, d.h. die Zuwachsrate von Succinat ist im aktiv atmenden Zustand größer als die vom Malat bzw. umgekehrt. Dieser Befund ist durch unabhängige Untersuchungen von

VON KORFF (64) mit anderer Versuchsanordnung bestätigt worden. Würde man für andere hier untersuchte Substratpaare, die durch einfache Reaktionen miteinander in Verbindung stehen, wie Acetat (C_2-Körper), ß-Hydroxybutyrat (C_4-Körper) oder Glutamat und Aspartat (Transaminierung) die gleiche Darstellung in Form von Zuwachsraten pro Zeiteinheit wählen, so würde man derartige "cross-overs" zwischen einzelnen Stoffwechselzuständen nicht finden. Da nach den "cross-over"-Theorien von B.CHANCE (65) solche Erscheinungen nur bei Redoxreaktionen auftreten, die an Kontrollmechanismen beteiligt sind, kann man annehmen, daß dieser "cross-over" innerhalb des Citratzyklus eine Folge definierter Aktivitätszustände der Atmungskette bzw. der oxydativen Phosphorylierung darstellt. Als mögliche Erklärung kann die folgende Hypothese angesehen werden: Im Zustand 4 liegt ein hoher Reduktionsgrad der Pyridinnucleotide vor und blockiert die Isocitrat- und Malat-Dehydrogenase, nicht jedoch die Decarboxylierung von Pyruvat oder die Succinat-Dehydrogenase. Dadurch können sich verschiedenste Substrate anhäufen, ausgenommen Succinat. Im Zustand 3 liegt ein beschleunigter Elektronentransport von DPN-abhängigen Substraten in die Atmungskette vor und kann somit einen Block für den Elektronentransport von der Succinat-Dehydrogenase auf Cytochrom b bilden. Daraus könnte der im Zustand 3 beobachtete relative Anstau von Succinat hergeleitet werden.

Beim Eintritt der Mitochondriensuspension in die anaerobe Phase zeigten sich unerwartete und bisher an Mitochondrien nie beobachtete Metabolitveränderungen in Form von Oszillationen. Dabei bildete sich nach einer vorausgehenden Phasenumkehr eine Schwingung aus, in welcher Malat und ß-Hydroxybutyrat gegen Succinat, Aspartat und Glutamat schwingen.

Metabolitoszillationen wurden bereits früher an anaeroben, gärenden Hefezellen beobachtet und neuerdings auch

an zellfreien Herzmuskelextrakten im anaeroben Zustand nachgewiesen (57,58,66).
Unabhängig von der Frage, ob solche Vorgänge physiologische Bedeutung haben oder nicht, erscheint es wichtig, deren Charakteristik eingehender zu studieren. Denn unter Anwendung des oben erwähnten "cross-over"-Theorems auf zwei innerhalb einer Reaktionsfolge benachbarte Metabolite, welche im Gegentakt schwingen, lassen sich die Angriffspunkte von Regulationsmechanismen erkennen. Dabei handelt es sich zumeist um Rückkopplungseffekte (feed back) oder um Vorauskopplung (feed forward) zwischen zwei Reaktionen, denen ein Reaktionspartner, in den meisten Fällen ein Coenzym, gemeinsam ist. Als Vermittler der Rückkopplung kommen, wenn man den Vergleich zur oszillierenden Hefe zieht, besonders die Pyridin- bzw. Adeninnucleotide in Frage, aber auch Reaktionsprodukte eines enzymatischen Abbauweges, die als Inhibitoren vorausgehender Reaktionsschritte wirksam werden können. Daß das Adeninnucleotidsystem im vorliegenden Fall ausscheidet, wird durch den Befund nahegelegt, daß innerhalb dieses Systems keine Oszillationen gefunden wurden.

Ein "cross-over" der oszillierenden Metabolite findet sich zwischen Malat und Succinat. Da ein solcher bereits bei Zustandsänderungen der Mitochondriensuspension unter aeroben Bedingungen gefunden wurde, kann angenommen werden, daß zwischen diesen Partnern einer Redoxreaktion eine Kontrollstelle liegt, die auch unter anaeroben Bedingungen wirksam bleibt. Die anderen an der Oszillation teilnehmenden Verbindungen sind nicht nur durch Reaktionsschritte miteinander verbunden; außerdem ist es wahrscheinlich, daß weitere Reaktionspartner dieses Geschehens analytisch nicht erfaßt wurden. Das vollständige Verständnis der beobachteten Erscheinung ist dadurch außerordentlich erschwert. Insbesondere läßt sich für die hier beschriebenen Metabolite keine zusammenhängende Reaktionsfolge formulieren, welche einen in einer Richtung verlaufenden Abbauweg wie die Glykolyse-

kette oder der Citratzyklus darstellt. Vielmehr schließen die hier bestimmten Metabolite auch Nebenwege ein. Das vorliegende Geschehen ist also außerordentlich komplex. Aus der Tatsache, daß über die gesamte Beobachtungsdauer - im aeroben wie im anaeroben - Glutamat und Aspartat gleichsinnig schwingen, kann gefolgert werden, daß diese beiden Substanzen durch die Transaminasereaktion miteinander gekoppelt sind, welche sich weitgehend im Gleichgewicht befindet. Erst gegen Ende des Versuchs treten zunehmende Unterschiede dieses Substratpaars auf und eine Gleichgewichtsverschiebung zur Seite des Aspartats deutet sich an.
Aus den bisher vorliegenden Ergebnissen läßt sich die Ursache für das Auftreten von Oszillationen noch nicht erklären. Vor allen ist im Gegensatz zur gärenden anaeroben Hefe unbekannt, in welcher Weise ein netto Durchsatz von Substrat durch eine Reaktionskette in anaeroben Mitochondrien stattfinden kann. Dies wäre jedoch eine Grundbedingung für ein oszillierendes biologisches System.

Hinsichtlich des Mechanismus der Oszillation ist zu fordern, daß im Verlauf des Gesamtgeschehens auch Oszillationen im Bereich der Pyridinnucleotide auftreten, denn die gefundenen Reaktionen lassen sich nicht ohne Beteiligung der Pyridinnucleotide erklären. Die Fluoreszenzmessung hat jedoch keine Oszillationen der Pyridinnucleotide gezeigt. Solche könnten allerdings verschleiert werden, da diese Messung das TPN- und das DPN-System gleichzeitig wiedergibt. Es wäre also daran zu denken, daß Wasserstoffverschiebungen zwischen diesen beiden Systemen auftreten, welche sich gegenseitig aufheben. Wie Untersuchungen von G. SCHÄFER (67) ergeben haben, findet man tatsächlich in der anaeroben Phase oszillierende Veränderungen der Pyridinnucleotide, wenn man durch enzymatisch-optischen Test diese für eine Vielzahl von Meßpunkten während der Anaerobiose getrennt bestimmt.

Dabei wird der Wasserstoff vom TPN-System auf das DPN-System übertragen und umgekehrt. Über eine längere Beobachtungszeit betrachtet, ergibt sich ein Wasserstofftransport aus dem TPN-pool, welcher zu Beginn stärker reduziert ist, in den DPN-pool, welcher anfänglich weniger stark reduziert vorliegt. Man kann also annehmen, daß Wasserstoff von TPN-abhängig umgesetzten Substraten auf DPN-abhängige Substrate übertragen wird. Daneben spielt sicher die Transhydrogenierung zwischen beiden Pyridinnucleotiden eine Rolle.

Unter in vivo Bedingungen könnten derartige Vorgänge z.B. bei akuter Anoxie oder Hypoxie des Herzmuskels auftreten und rasch zu einer Entgleisung des gesamten mitochondrialen Stoffwechsels führen. Da die Mitochondrienstruktur auch stark vom Funktionszustand der Partikel abhängig ist, könnten unter solchen Bedingungen auch irreversible Schädigungen der Mitochondrien auftreten.

Das Substratpaar ß-Hydroxybutyrat/Acetoacetat ist frei permeabel und stellt für die Mitochondrien nach KLINGENBERG (24) eine ähnliche Stoffwechselsackgasse wie das Paar Laktat/Pyruvat für das Cytoplasma dar. Es wurde postuliert, daß das über die Blutbahn transportierte ß-Hydroxybutyrat/Acetoacetat als Informationsüberträger des mitochondrialen Redoxzustandes wirken kann (24).

Da nach diesen Befunden die im anaeroben Funktionszustand eintretenden Stoffwechselveränderungen sich besonders stark im ß-Hydroxybutyrat ausdrücken, wäre auch daran zu denken, daß über die damit veränderten Redoxpotentiale auch Stoffwechseländerungen in den Mitochondrien anderer Organe induziert werden.

Abschließend kann gesagt werden, daß die durchgeführten Messungen von Isotopen-Fluxen in Abhängigkeit von einzelnen Funktionszuständen die dynamische Struktur des mitochondrialen Stoffwechsels beweisen. Jedoch wird durch eine Vielzahl von untereinander abhängigen Parametern und vor allem durch die noch weitgehend unbekannte

Verteilung von Substraten und wasserstoffübertragenden Cofaktoren auf verschiedene Kompartimente der Mitochondrienstruktur das vollständige Verständnis des hier vorliegenden Geschehens erschwert. Eine weitere Aufklärung kann nur durch quantitatives Erfassen der untersuchten Metabolite, also durch Bestimmung der in jedem Stadium auftretenden spezifischen Aktivität ermöglicht werden.

V ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wird eine Methode beschrieben, die es ermöglicht, Aminosäuren und Intermediate des Citratzyklus auf chromatographischem Wege zu trennen. Diese Methode bedient sich der Säulenchromatographie auf Dowex und Kieselgel oder auf Dünnschichtplatten.

Die Methode wird angewandt, um organische Säuren, welche bei der Oxydation von 3- ^{14}C-Pyruvat durch isolierte Mitochondrien des Kaninchenherzens entstehen, zu trennen und deren Radioaktivität zu bestimmen.

Die Darstellung von Mitochondrien des Kaninchenherzens, welche Atmungskontrolle durch oxydative Phosphorylierung aufweisen, wird beschrieben. Die einzelnen Funktionszustände werden durch Messung der Atmung mit Hilfe einer elektrochemischen Sauerstoffmessung, sowie durch synchrone Registrierung des Redoxzustandes der Pyridinnucleotide nachgewiesen.

Mitochondrien werden mit 3- ^{14}C-Pyruvat inkubiert und der Einbau von Radioaktivität in die Metabolite in verschiedenen Stoffwechselzuständen bestimmt.
Es wird gezeigt, daß den Funktionszuständen der Atmungskette auch reproduzierbare definierte metabolische Zustände auf dem Substratniveau entsprechen. Dies zeigt sich in den unterschiedlichen Einbauraten von ^{14}C-Aktivität in das mitochondriale Metabolitmuster während der einzelnen Stoffwechselzustände.
Es wird nachgewiesen, daß innerhalb des Citratzyklus "cross-over"-Punkte auftreten, d.h. metabolische Regulationsmechanismen wirksam werden.
Nach Übergang in den anaeroben Zustand zeigen Mitochondrien metabolische Oszillationen, wobei "cross-over"-Punkte wie im aeroben zwischen Succinat und Malat auftreten. Der Nachweis der Oszillationen wird in mehreren Versuchen erbracht.

Das bestimmte Metabolitmuster reicht nicht aus, um den Gesamtmechanismus dieser Vorgänge zu erklären. Die Analyse der Adeninnucleotide (ATP,ADP,AMP) ergibt, daß diese nicht für die Auslösung der Oszillationen verantwortlich oder an diesen beteiligt sind. In aeroben Stoffwechselzuständen entspricht das Verhalten der Adeninnucleotide den theoretischen Forderungen.
Ein Mechanismus unter Einbeziehung der mitochondrialen Pyridinnucleotide, welche an Oszillationen teilnehmen, sowie die mögliche Bedeutung derartiger Vorgänge unter in vivo Bedingungen werden diskutiert.

VI LITERATURVERZEICHNIS

1 Green D. E., Y. Hatefi; Science 133, 13 (1961)

2 Palade G.E.; Annat. Rec. 114, 427 (1952)

3 Palade G.E.; J. Histochem. Cytochem. 1, 188 (1953)

4 Bing R. J.; Klin. Wschr. 34, 1 (1956)

5 Bing R. J.; Siegel A., Ungar I. und Gilbert M.; Am. J. Med. 16, 504 (1954)

6 Bernsmeier A. und W. Rudolph; Forum cardiologicum 5, 6 (1962), Fa. C. F. Boehringer & Soehne, Mannheim Waldhof

7 Lehninger A. L.; Harvey Lect. 12, 176 (1955)

8 Bücher Th. und M. Klingenberg; Angew. Chemie 70, 552 (1958)

9 Klingenberg M.; 11. Moosbacher Kolloquium über freie Nucleotide und ihre biolog. Bedeutung, Seite 82, Springer Verlag 1961

10 Borst P.; Funktionelle und morpholog. Organisation der Zelle, Springer Verlag 1963 Seite 137

11 Lamprecht W. und G. Schäfer; Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 326, 259 (1961)

12 Lynen F.; Ann. Rev. Biochem. 24, 653 (1955)

13 Bloch K.; Ann. Rev. Biochem. 21, 273 (1952)

14 Slater E. C.; Structure and Function of Muscle II 3, 125 New York, London 1960

15 Krebs H. A.; Biochem. J. 34, 442, 775 (1940)

16 Krebs H. A. in D. M. Greenberg: Chemical Pathways of Metabolism Vol. I, 109 New York 1954

17 Leuthardt F.: Lehrbuch der physiol. Chemie 14. Aufl. 1959, S. 261, - W. De Gruyter & Co - Berlin

18 Lehninger A. L.; The Mitochondrion S. 146, New York 1964

19 Lynen F. u. Mitarbeiter; Biochem. Zeitschr. 330, 269 (1958)

20 Lehninger A. L. und Greville; Biochem., Biophys.Acta 12, 188 (1953)

21 Krebs H. A.; Biochem. J. 80, 225 (1961)

22 Williamson I. R. und H. A. Krebs; Biochem. J. 80, 540 (1961)

23 Devlin T. M. und B. H. Bedell; J. Biol.Chem. 235, 2134 (1960)

24 Klingenberg M. und H. v. Häfen; Biochem. Zeitschr. 337, 120 (1963)

25 Lehninger A. L.; The Mitochondrion S. 60, New York 1964

26 Lehninger A. L.; Harvey Lect. 12, 176 (1955)

27 Slater E. C.; Conférences et Rapports 3^{me}Congrès Internat. de Biochemie, Bruxelles 1955, S. 264, Liège 1956

28 Slater E. C.; Nature 172, 975 (1953)

29 Chance B. und Williams; Adv. Enzymol. 17, 65 (1956)

30 Myers D. K. und E. C. Slater; Biochem. J. 67, 558,572 (1957)

31 Hülsmann W. G. und E. C. Slater; Nature 180, 372 (1957)

32 Klingenberg M. und Schollmeyer; Biochem. Zeitschr. 333, 328 (1961)

33 Chance B. und Hollunger; J. Biol. Chem. 236, 1534 (1961)

34 Penefsky H. S. in: B. Chance, Energy-linked Functions of Mitochondria, Academic Press, New York 1963, Seite 87

35 Chance B. und G. Hollunger; J. Biol. Chem. 238, 418 (1963)

36 Weichselbaum T. E.; Amer. J. clin. Path. 10, 40 (1946)

37 Chance B. und R. Williams; Nature 175, 1120 (1955)

38 Hagihara B.; Biochim. Biophys. Acta 46, 134 (1961)

39 Kunz W. und F. Müller; Acta. Biol. Med. Germ. 9, 437 (1962)

40 Estabrook R. W. und P. K. Maitra; Anal. Biochem. 3, 369 (1962)

41 Estabrook R.W.; Anal. Biochem. 4, 231 (1962)

42 Bücher Th., H. J. Hohorst und F. H. Kreutz; Biochem.Z. 332, 18 (1959)

43 Slater E.C., C. Tamblyn-Hague und W. Davis van Thienen; Biochim.Biophys. Acta 96, 206 (1965)

44 Davis E. J.; Biochim. Biophys. Acta 96, 217 (1965)

45 Emmerich G.; Dissertation, Med.Fak.München 1965

46 von Korff R.W.; J. Biol.Chem. 240, 1351 (1964)

47 Bulen W. A., J. E. Warner und R. C. Burrell; Anal.Chem.24, 187 (1952)

48 Kinnory D. S., Y. Takeda und D. M. Greenberg; J.Biol.Chem. 212, 379 (1955)

49 Stahl E.; Dünnschicht Chromatographie, Laboratoriumshandbuch, Springer-Verlag 1962

50 Snyder F. und S. Nelson; Analyt. Bioch. 4, 128 (1962)

51 Lamprecht W. und I. Trautschold; Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 311, 245 (1958)

52 vergl. Testkombination TC K d. Fa. Boehringer & Söhne, Mannheim Waldhof

53 Adam H.; Dissertation, Universität Marburg/L. 1955

54 von Korff R. W.; Anal. Biochem. 8, 171 (1964)

55 Siverstein E. und P.D. Boyer; Anal.Biochem. 8, 470 (1964)

56 Montgomery C. M. und I. L. Webb; J.Biol.Chem. 221, 359 (1956)

57 Chance B.; Harvey Lect. Series XIL, 145 (1954)

58 Chance B., B. Hess und Betz; Biochem.Biophys.Res.Commun. 16, 182 (1964)

59 Klingenberg M. und P. Schollmeyer; Biochem.Zeitschr. 333, 335 (1960)

60 Klingenberg M. und P. Schollmeyer; Biochem.Zeitschr. 335, 231 (1961)

61 Klingenberg M. und P. Schollmeyer; Biochem.Zeitschr. 335, 243 (1961)

62 Wieland O., L. Weiss und L. Eger-Neufeld; Biochem.Zeitschr. 339, 501 (1964)

63 Krebs H.A., Bull und Johns; Hopkins Hospital 95, 19 (1954)

64 von Korff; Information Exchange Group No.1, Scientific Memo 479 (1965)

65 Chance B., W. Holmes, J. Higgins und C. M. Connelly; Nature (London) 182, 1190 (1958)

66 Frenkel R.; 150.National Meeting of the American Chemical Society 14. Sept. 1965 Atlantic City N.J.

67 Schäfer G.; Nature (London) 1966 im Druck

Lebenslauf

Am 30. Mai 1935 wurde ich, Peter Werner Balde, in München geboren. Mein Vater war als Berufsoffizier Major der damaligen Deutschen Luftwaffe.

Von 1942 bis 1948 besuchte ich die Volksschule in München, Murnau, Wittibreut und Reichertsbeuern. Anschließend ging ich auf die Oberrealschule in Reichertsbeuern und später auf die Klenze-Oberrealschule in München. Nach Erlangung der mittleren Reife trat ich zwei Jahre in die Chemieschule Dr. Erwin Ehlhart in München ein und bestand dort das staatliche Abschlußexamen. Dann arbeitete ich von 1956 bis 1961 als Chemotechniker im Biochemischen Laboratorium der Technischen Hochschule München. Während dieser Zeit besuchte ich vier Jahre das Abendgymnasium für Berufstätige und erhielt am 19.6.1961 das Reifezeugnis.

Seit dem 1.11.1961 studiere ich an der Universität München Humanmedizin. Hier bestand ich 1962 die naturwissenschaftliche Vorprüfung und 1964 die ärztliche Vorprüfung. Zur Zeit stehe ich im medizinischen Staatsexamen.